

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
Leiter: Prof. Dr. Claus Vogelmeier

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,  
Standort Marburg

# Cathelizidine als Immunmodulatoren der angeborenen Immunität

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Kerstin Kändler  
aus Stuttgart

Marburg 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 31.08.2006

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

**Dekan:** Prof. Dr. Bernhard Maisch

**Referent:** PD Dr. Dr. Robert Bals

**Korreferent:** Prof. Dr. Stefan Bauer

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>4</b>
<b>2 EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Komponenten der angeborenen Immunität des Respirationstrakts</b>	<b>6</b>
2.1.1 Zellen der angeborenen Immunität	8
2.1.2 Toll-like Rezeptoren	10
2.1.3 Antimikrobielle Peptide	13
<b>2.2 Funktionen von LL-37 und CRAMP</b>	<b>17</b>
2.2.1 Antimikrobielle Aktivität	17
2.2.2 Modulation der Immunantwort	20
2.2.3 Regulation der Expression von LL-37 und CRAMP	23
<b>2.3 Infektionen der Atemwege und Bedeutung der angeborenen Immunität bei der Klärung der Infektion</b>	<b>23</b>
2.3.1 Akute Infektion	23
2.3.2 Cystische Fibrose als Beispiel einer chronischen Entzündung	24
<b>2.4 Fragestellung</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
3.1 Zellkultur, Bakterien, Antikörper, Peptide	27
3.2 Mäuse	28
3.3 Ermittlung der antimikrobiellen Aktivität von CRAMP	28
3.4 Stimulation von Zellen in vitro	29
3.5 Infektion und Präparation von Mäusen	29
3.6 Ermittlung der Bakterienzahl in der Lunge	30
3.7 Aufbereitung der BAL	30
3.8 ELISA („enzyme-linked immuno sorbent assay“)	31
3.9 Gelelektrophorese und Western Blot	31
3.10 Zytokin Array	32
3.11 Immunhistochemie	32
3.12 Isolation von RNA und RT-PCR	33

3.13 Isolation neutrophiler Granulozyten und Makrophagen aus der Bauchhöhle von Mäusen	33
3.14 Stimulation peritonealer Makrophagen und neutrophiler Granulozyten	34
3.15 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies	34
3.16 LPS-Galaktosamin Modell	35
3.17 Hervorrufen einer Sepsis durch <i>E. coli</i> Infektion der Lunge	35
3.18 Isolation humaner Monozyten und Generierung von DZ	35
3.19 Stimulation von DZ und Analyse der Zytokinabgabe	36
3.20 FACS („fluorescence-activated cell sorting“) Analyse	36
3.21 Aktivierung allogener CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch DZ	37
3.22 Untersuchung von DZ auf Apoptose und Nekrose	38
3.23 Statistische Analyse	38
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>4.1 CRAMP Expression bei Infektion der Atemwege</b>	<b>39</b>
4.1.1 Infektion mit <i>P. aeruginosa</i> PAO1	39
4.1.1.1 Die bakterielle Infektion der Lunge wird zügig geklärt	39
4.1.1.2 Die akute bakterielle Infektion der Lunge führt zu einer neutrophilen Entzündung	40
4.1.1.3 Die bakterielle Infektion führt zu einer gesteigerten Expression von CRAMP	42
4.1.2 CRAMP wird auch bei Infektion mit anderen Bakterien exprimiert	44
4.1.3 Die Expression von CRAMP wird in Atemwegsepithelzellen in vitro induziert	46
<b>4.2 Die antimikrobielle Aktivität von CRAMP in vitro</b>	<b>47</b>
<b>4.3 Funktion von CRAMP in vivo bei bakterieller Infektion der Lunge</b>	<b>48</b>
4.3.1 Die antimikrobielle Aktivität von CRAMP in vivo bei Infektion des Respirationstrakts ist nicht nachweisbar	48
4.3.2 CRAMP KO Mäuse klären eine Infektion mit mukoiden <i>P. aeruginosa</i> schneller aus ihren Lungen als WT Mäuse	49
4.3.3 Zu Beginn der Infektion zeigen CRAMP KO Mäuse ein verändertes Zytokinprofil und einen erhöhten Einstrom von neutrophilen Granulozyten	50
4.3.4 Noch sieben Tage nach der Infektion unterscheidet sich die Zytokinabgabe von CRAMP KO und WT Mäusen	53

<b>4.4 Untersuchung von Immunzellen aus WT und CRAMP KO Mäusen</b>	<b>54</b>
4.4.1 Die Zytokinabgabe von Immunzellen aus CRAMP KO und WT Mäusen unterscheidet sich nicht	55
4.4.2 Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies unterscheidet sich nicht zwischen neutrophilen Granulozyten aus WT und KO Mäusen	55
<b>4.5 Einfluss von LL-37 und CRAMP auf Immunzellen in vitro</b>	<b>56</b>
4.5.1 LL-37 inhibiert die Aktivierung von humanen Makrophagen durch LPS	57
4.5.2 CRAMP inhibiert die Aktivierung von murinen Makrophagen durch LPS	58
4.5.3 CRAMP hemmt die Zytokin Abgabe von murinen neutrophilen Granulozyten	59
4.5.4 LL-37 inhibiert die Reifung von DZ durch LPS	61
4.5.5 Die bekannten Signalwege von LL-37 sind nicht an der inhibitorischen Wirkung von LL-37 auf die Aktivierung von DZ beteiligt	65
4.5.6 LL-37 ist für unreife DZ nicht toxisch	65
4.5.7 LL-37 inhibiert die Aktivierung von DZ durch TLR2 und TLR5 Liganden	66
4.5.8 LL-37 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von DZ durch Zytokine	68
<b>4.6 Effekt der LPS Bindung von CRAMP in vivo</b>	<b>69</b>
4.6.1 CRAMP KO Mäuse zeigen erhöhte Letalität in einem LPS Sepsismodell	69
4.6.2 CRAMP KO Mäuse zeigen erhöhte Letalität in einem bakteriellen Sepsismodell	70
<b>DISKUSSION</b>	<b>71</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>84</b>

## 1 Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem besteht aus einer Reihe von Zellen, die Mikroorganismen erkennen und abtöten können, sowie aus vielen löslichen Bestandteilen wie dem Komplementsystem, Proteasen und antimikrobiellen Proteinen und Peptiden. Eine Gruppe antimikrobieller Peptide sind die Cathelizidine, von denen sowohl Mensch als auch Maus nur ein einziges besitzen. Das humane LL-37/hCAP18 und das murine CRAMP sind strukturhomologe kationische Peptide mit einem ähnlichen Expressionsprofil und einem ähnlichen Wirkungsspektrum. Neben der antimikrobiellen Aktivität besitzt LL-37/hCAP18 zahlreiche weitere Funktionen: In vitro ist es chemotaktisch für Immunzellen und moduliert deren Aktivität, bindet LPS, induziert Proliferation und Migration von Epithel- und Endothelzellen und hat Einfluss auf die Apoptose verschiedener Zelltypen. Welche der genannten Funktionen in vivo bei einer Infektion von Bedeutung sind, ist noch weitgehend unklar. In Lungenspülungen von Patienten mit einer Infektion der Lunge wurden erhöhte Level an LL-37/hCAP18 nachgewiesen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von LL-37/hCAP18 und CRAMP während einer bakteriellen Infektion der Lunge zu untersuchen. Zunächst wurde festgestellt, dass CRAMP, genauso wie LL-37/hCAP18, bei einer Infektion des Respirationstrakts von Mäusen in erhöhten Konzentrationen im Atemwegssekret vorliegt. Die Expression von CRAMP konnte in Epithelzellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Um die antimikrobielle Aktivität von CRAMP in vivo nachzuweisen, wurden Mäuse, bei denen das Gen für CRAMP zerstört ist (KO), infiziert und der Verlauf der Infektion mit Wildtyp (WT) Tieren verglichen. Es konnte allerdings kein Unterschied in der Klärung einer akuten bakteriellen Infektion der Lunge nachgewiesen werden. Deswegen wurden als nächstes die immunmodulatorischen Funktionen von LL-37 und CRAMP untersucht. Es zeigte sich, dass LL-37 und CRAMP die Zytokinabgabe von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen durch LPS hemmt. Der Einfluss von LL-37 auf die Aktivierung von Dendritischen Zellen wurde daraufhin weiter untersucht. Es zeigte sich, dass LL-37 auch die Aktivierung durch die TLR2 und TLR5 Liganden, LTA und Flagellin, nicht jedoch die durch Zytokine hervorgerufene Aktivierung hemmt. Dendritische Zellen wurden in ihrer Zytokinabgabe, Expression von costimulatorischen Molekülen und ihrer Fähigkeit naive T-Zellen zu aktivieren gehemmt. Um die Bedeutung dieser Funktionen in vivo nachzuweisen, wurden CRAMP KO und WT Mäuse in zwei Sepsismodellen verglichen. In beiden Modellen

hatten CRAMP KO Mäuse eine erhöhte Letalität. Bei einem chronischen *P. aeruginosa* Infektionsmodell der Lunge zeigte sich jedoch ein überraschender Phänotyp der CRAMP KO Mäuse: Sie waren in der Lage die Bakterien schneller aus ihren Lungen zu klären als WT Mäuse. Um dies zu erklären, wurden neutrophile Granulozyten und Makrophagen aus WT und CRAMP KO Mäusen isoliert und auf ihre Aktivierbarkeit durch LPS untersucht, wobei jedoch kein Unterschied festgestellt werden konnte. Die beobachteten Effekte stammen daher von dem bei einer Infektion abgegebenem CRAMP, das Immunzellen hemmt, um so die Gefahr einer Sepsis zu minimieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Cathelizidine LL-37/hCAP18 und CRAMP weit reichende immunmodulatorische Funktionen besitzen und bei einer bakteriellen Infektion nicht auf ihre antimikrobielle Funktion beschränkt sind. Die durchgeführten Infektionsversuche legen sogar nahe, dass die antimikrobielle Aktivität von CRAMP bei Klärung einer bakteriellen Infektion der Lunge keine wesentliche Rolle spielt. Dagegen konnte die immunmodulatorische Funktion von CRAMP bei Sepsis und chronischer Lungeninfektion in vivo nachgewiesen werden.

## 2 Einleitung

Cathelizidine sind eine Klasse von antimikrobiellen Peptiden (AMP). AMP sind endogene Antibiotika und Bestandteil der angeborenen Immunität von Säugetieren. Sie werden von verschiedenen Zellen des Körpers gebildet und ausgeschüttet und besitzen antimikrobielle Aktivität gegenüber verschiedenen Mikroorganismen. Die meisten AMP sind außerdem Effektormoleküle der angeborenen Immunität [1,2]. Sie können Immunzellen rekrutieren und die Aktivität dieser beeinflussen. Teilweise sind AMP sogar an so komplexen Vorgängen wie Wundheilung, Proliferation, Angiogenese und Tumorwachstum beteiligt [3]. Die Wirkungsweise bei den genannten Vorgängen ist noch nicht komplett verstanden und ist ein aktives Forschungsgebiet der letzten Jahre mit vielen neuen Erkenntnissen. Auch diese Arbeit befasst sich zu einem großen Teil mit neuen, immunregulatorischen Funktionen von AMP.

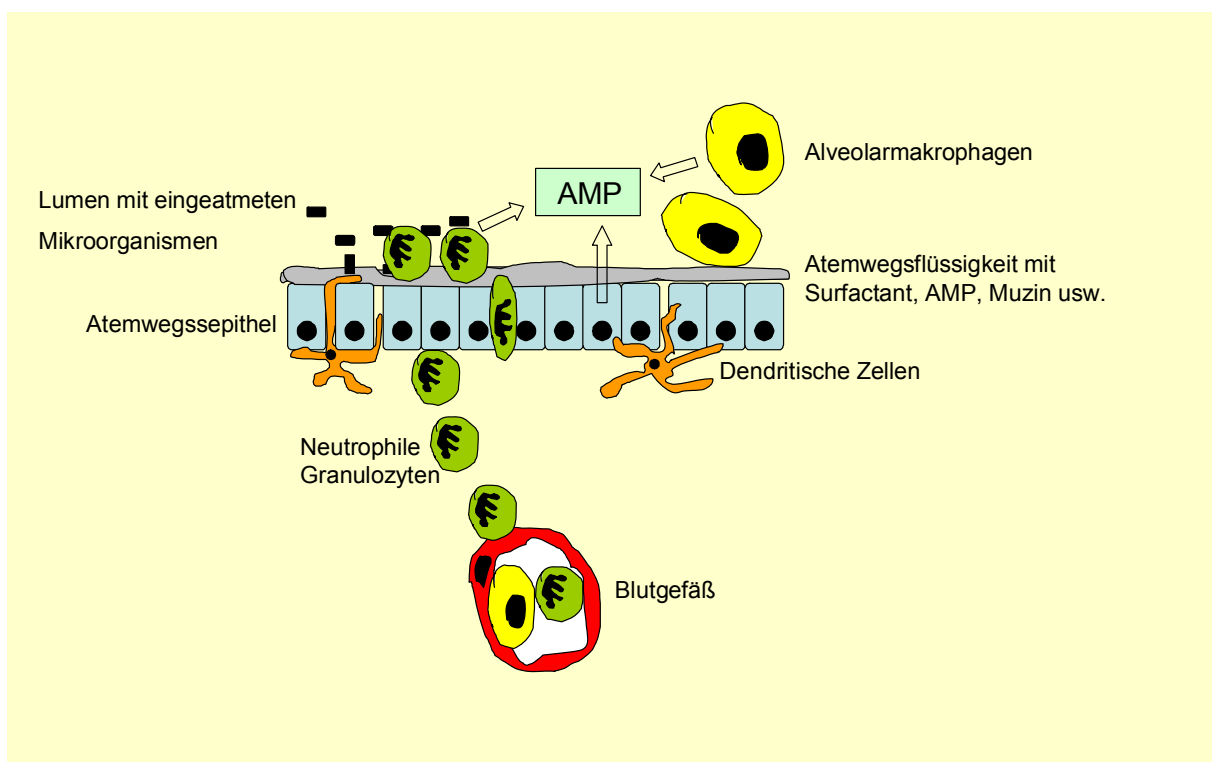
### 2.1 Komponenten der angeborenen Immunität des Respirationstrakts

Bei gesunden Menschen ist der untere Respirationstrakt steril. Die Lunge wird durch eine Schleimschicht auf den Epithelzellen und das Zilien tragende Bronchialepithel vor eingeatmeten Mikroorganismen geschützt. Dreckpartikel und Pathogene, die in die Lunge gelangen, werden im Schleim gefangen, durch die Zilienbewegung des Bronchialepithels nach oben transportiert und abgehustet. Gelingt es Mikroorganismen trotzdem, sich in der Lunge festzusetzen, wird eine Infektion in aller Regel durch das Atemwegsepithel und die vorhandenen Immunzellen verhindert. An der Immunantwort des Respirationstrakts sind Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt: Alveolar-Makrophagen, Dendritische Zellen (DZ), neutrophile Granulozyten, Eosinophile, Mastzellen, natürliche Killerzellen und Lymphozyten [4]. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass neben den klassischen Immunzellen auch die Atemwegsepithelzellen aktiv an der Immunantwort beteiligt sind. Sie können wie DZ und Makrophagen Pathogene über Toll-like Rezeptoren (TLR) erkennen und tragen durch die Abgabe von Zytokinen und AMP zur Rekrutierung von Immunzellen sowie zur direkten Lyse von Bakterien bei [5].

Für die schnelle Antwort auf eingedrungene Pathogene ist das angeborene Immunsystem von besonderer Bedeutung (Abb. 1). Residente Zellen des angeborenen Immunsystems, wie die Alveolarmakrophagen und DZ, können sofort auf eingedrungene Pathogene reagieren. Sie



phagozytieren und töten diese und beeinflussen durch die Abgabe von Zytokinen und Chemokinen den Verlauf der weiteren Immunantwort. Das Atemwegssekret ist eine Schleimschicht, die die Epithelzellen bedeckt und lösliche Bestandteile des angeborenen Immunsystems enthält. Durch sie wird das Gewebe vor Kontakt mit Pathogenen geschützt [6]. Im Atemwegssekret findet man die Proteine des Komplementsystems, Surfactantproteine, Antiproteasen, Clarazellproteine (CC10, CCSP), Proteine der PLUNC („palate, lung, and nasal epithelium clone“) Familie, sowie eine Vielzahl antimikrobieller Proteine und Peptide, die an der Abwehr von Keimen beteiligt sind [7-9]. Die Zellen der adaptiven Immunantwort gelangen dagegen erst nach mehreren Tagen in das infizierte Gewebe. Ein schnelles und effizientes Eingreifen der angeborenen Immunantwort ist deswegen wesentlich für eine schnelle Klärung der Infektion.



**Abb. 1 Komponenten der angeborenen Immunität in der Lunge:** In der Lunge befinden sich residente Makrophagen und DZ, die eingedrungene Fremdstoffe phagozytieren. Das Atemwegssepithel ist durch eine Sekretschicht, die AMP und weitere lösliche Bestandteile des angeborenen Immunsystems enthält, vor direktem Kontakt mit eingeatmeten Pathogenen geschützt. AMP werden von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen abgegeben. Bei einer Infektion können neutrophile Granulozyten schnell aus der Blutbahn rekrutiert werden.

### 2.1.1 Zellen der angeborenen Immunität

#### *Neutrophile Granulozyten*

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Immunzellen, die bei einer bakteriellen Infektion in das infizierte Gewebe einwandern. Sie reagieren mit Chemotaxis auf Zytokine wie z.B. IL-8 (Mensch) oder KC (Maus), die von Immun- und Epithelzellen am Infektionsherd abgegeben werden. Neutrophile Granulozyten tragen durch Phagozytose und intrazelluläres Abtöten von Pathogenen zur Klärung von Infektionen bei. Hierfür werden Pathogene durch Endozytose aufgenommen. Das dabei entstehende Phagosom verschmilzt mit verschiedenen Granula, die unter anderem Proteasen und AMP enthalten, zum Phagolysosom. Durch die mit der Verschmelzung einhergehende Veränderung des pH Werts werden die Proteasen und AMP aktiviert und so das Milieu zum Abtöten der aufgenommenen Mikroorganismen geschaffen. Man unterscheidet azurophile, spezifische und tertiäre Granula sowie Lysosomen. Sie enthalten unterschiedliche Proteine und verschmelzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Phagosom. In azurophilen Granula sind z. B. Defensine enthalten; LL-37/hCAP18 befindet sich dagegen in den spezifischen Granula. NADPH Oxidase in der Membran des Phagolysosoms produziert Superoxid ( $O_2^-$ ), welches weitere reaktive Sauerstoffspezies (RSS) bildet. Lange glaubte man, dass diese direkt zum Abtöten von Bakterien beitragen und unterschied zwischen dem sauerstoffabhängigen und sauerstoffunabhängigen (durch Proteasen und AMP) Abtöten von phagozytierten Mikroorganismen. Inzwischen ist diese Sicht umstritten. Die heute gängige These ist, dass RSS zwar benötigt werden, allerdings eher indem sie das richtige Milieu schaffen und aktivierend wirken, als dass sie Bakterien direkt töten [10]. Ins Gewebe eingewanderte neutrophile Granulozyten haben eine kurze Lebensdauer von wenigen Stunden. In dieser Zeit phagozytieren und töten sie so viele Bakterien wie möglich. Außerdem können sie auch durch Exocytose von Vesikeln Zytokine und AMP ins extrazelluläre Milieu abgeben. Dadurch entsteht Entzündung und weitere Immunzellen werden rekrutiert. Nach wenigen Stunden sterben die neutrophilen Granulozyten am Infektionsherd. Kürzlich wurde gezeigt, dass sterbende neutrophile Granulozyten extrazelluläre Fallen (NET) bilden können [11]. Nukleäre DNA und antimikrobielle Substanzen aus der Zelle bilden bei NET ein Geflecht mit einer hohen lokalen antimikrobiellen Aktivität, in dem sich Bakterien verfangen und abgetötet werden.

## ***Makrophagen***

Wie in den meisten anderen Geweben sind auch in gesunden Atemwegen residente Makrophagen in geringer Menge vorhanden. In der Lunge werden diese gewebspezifischen Makrophagen als Alveolarmakrophagen bezeichnet. Bei einer Infektion gehören sie zu den ersten Immunzellen, die mit den Pathogenen in Kontakt kommen. Dadurch werden sie aktiviert und reagieren mit der Abgabe von Zytokinen und Chemokinen. Auf diese Weise sind sie maßgeblich an der Initiierung und Regulierung der Immunantwort beteiligt. Durch die abgegebenen Chemokine werden Immunzellen an den Infektionsherd rekrutiert, darunter auch Monozyten aus dem Blut, die sich im Gewebe zu Makrophagen differenzieren. Makrophagen besitzen verschiedene Rezeptoren, um Pathogene zu erkennen und aufzunehmen, darunter auch TLR. Die Hauptaufgaben von Makrophagen sind die Phagozytose und das Töten der phagozytierten Mikroorganismen, die Präsentation von Antigenen und die Immunmodulation durch die Abgabe von verschiedenen Zytokinen (z.B. IL-8, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IL-12) und Wachstumsfaktoren [12]. Das Abtöten der aufgenommenen Bakterien findet wie in neutrophilen Granulozyten im Phagosom mit Hilfe von Proteasen, AMP und reaktiven Sauerstoffspezies statt. Kleine Teile der verdauten Mikroorganismen werden dann zusammen mit Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) auf der Zelloberfläche präsentiert. Naive T-Zellen werden durch Kontakt mit diesen Antigenen und costimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche von Makrophagen aktiviert. Makrophagen stellen auf diese Weise ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort dar [12,13].

## ***Dendritische Zellen***

DZ sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen. Im Respirationstrakt gibt es ein dichtes Netz residenter DZ. Man findet sie im peripheren Lungengewebe, im Bindegewebe, in den alveolaren Zwischenräumen und vor allem in den Atemwegen. Dort bilden sie ein zusammenhängendes Netzwerk unter und zwischen den Epithelzellen [14]. Sie nehmen Pathogene und tote körpereigene Zellen und Zelltrümmer auf, prozessieren diese und präsentieren Antigene zusammen mit MHC und costimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche. Damit wandern sie ins lymphatische Gewebe und präsentieren die Antigene naiven T-Zellen, die dadurch aktiviert werden. Auf diese Weise stellen DZ das wichtigste Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar. Es gibt verschiedene

Untergruppen von DZ, die sich in ihren Oberflächenmarkern und der gewebspezifischen Verteilung im Körper unterscheiden [15]. Wieweit sie sich auch in ihrer Funktion unterscheiden ist noch nicht vollständig geklärt. Generell unterscheidet man aber zwischen unreifen und reifen DZ. Unreife DZ haben eine hohe phagozytotische Aktivität und nehmen Fremdkörper auf. Mikroorganismen erkennen sie über TLR (siehe Tabelle 1). Lektin-, Fc- und Komplement Rezeptoren sind für die Phagozytose von Mikroorganismen verantwortlich, wogegen eine Aktivierung von TLR die Reifung der DZ induziert. Die Reifung von DZ geht mit phänotypischen und funktionalen Veränderungen einher [16]. So nimmt die Expression von MHC und costimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche zu und Veränderungen im Zytoskelett und der Expression von Adhäsionsmolekülen ermöglichen das Wandern der reifen DZ zu den lymphatischen Organen. Außerdem verändert sich das Expressionsprofil der abgegebenen Zytokine. Ein wichtiges Zytokin reifer DZ ist IL-12p70, das eine Th1 Antwort induziert. Auch die Fähigkeit, naive T-Zellen zu aktivieren, wird verstärkt. Außer Mikroorganismen und deren Produkten können auch Zytokine, die typischerweise bei Infektionen vorliegen, wie IL-1, TNF- $\alpha$  und Typ 1 Interferone, sowie nekrotische Körperzellen DZ aktivieren [15].

### 2.1.2 Toll-like Rezeptoren

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits erwähnt, besitzen die Zellen der angeborenen Immunantwort TLR, um Pathogene zu erkennen und von körpereigenen Zellen zu unterscheiden. Der Name leitet sich von ihrer Homologie zu dem *Drosophila* Protein Toll ab. Dieses ist an der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege beteiligt. Später fand man heraus, dass auch das Immunsystem von Insekten Pathogene erkennen kann, und dass Toll dabei an der Erkennung von Pilzen und grampositiven Bakterien beteiligt ist [17]. Durch Datenbankrecherche fand man zu Toll homologe Gene bei Säugetieren und nannte die Proteine „Toll-like“ Rezeptoren. Bei den Säugetieren sind TLR direkt für die Erkennung von Pathogenen zuständig. Damit kann auch das angeborene Immunsystem zwischen körpereigen und fremd unterscheiden und ist bedeutend spezifischer in Pathogen Erkennung und Immunantwort als man lange Zeit angenommen hatte. TLR erkennen verschiedene Strukturen, die für Mikroorganismen spezifisch sind und bei Wirtszellen nicht vorkommen. Diese Strukturen von Mikroorganismen, die vom Immunsystem mittels Rezeptoren erkannt werden können, nennt man pathogenassoziierte molekulare Muster oder PAMPs („pathogen-

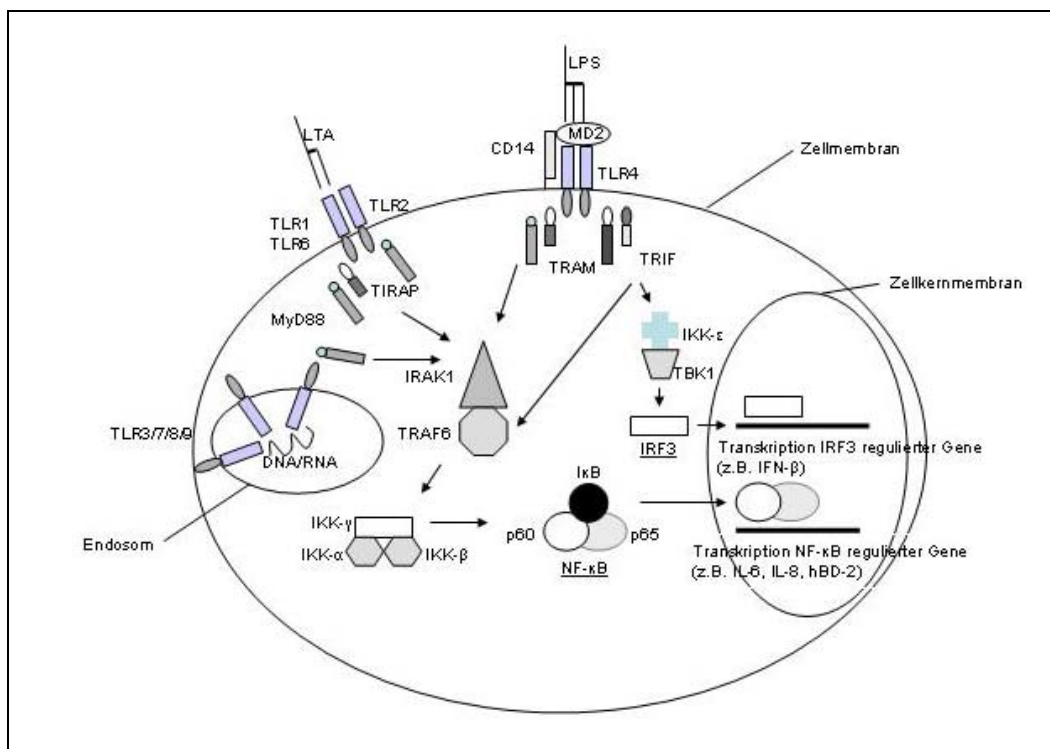
associated molecular patterns“). Die Rezeptoren der Wirtszellen, die PAMPs erkennen, sind die mustererkennenden Rezeptoren (PRR; „pattern recognition receptor“). PAMPs sind essentielle Strukturen von Mikroorganismen und können daher von den Mikroorganismen nur schwer verändert werden. Hierzu gehören z. B. verschiedene Bestandteile der bakteriellen Zellwand, wie Lipopolysaccharid (LPS) und Lipoteichonsäure (LTA), oder auch bakterielle und virale Nukleinsäuren. Zu den PRR gehören unter anderem die zehn bisher beim Menschen bekannten TLR, die die verschiedensten Strukturen erkennen (Tabelle 1).

TLR	Expression in verschiedenen Zelltypen				Liganden (Beispiele)
	Monozyt	myeloide DZ (mDZ)	in vitro differenzierte DZ	Atemwegs- epithel	
TLR1	++	++	++	++	Triacyllipopeptide (Bakterien)
TLR2	++	++	++	++	Zellwandbestandteile von Bakterien, Pilzen und Viren (z.B. Lipoproteine, Glycolipide, Peptidoglycan, LTA)
TLR3	-	++	++	++	dsRNA (Viren)
TLR4	++	-	++	++	LPS (Bakterien), Mannan (Pilze), Hüllproteine (Viren)
TLR5	++	+	+	++	Flagellin (Bakterien)
TLR6	++	++	++	+	Diacyllipopetide ( <i>Mycoplasma</i> ), Zymosan (Hefe)
TLR7	+	+	-	+	ssRNA (Viren)
TLR8	++	++	++	+	ssRNA (Viren)
TLR9	-	-	-	+	CpG DNA (Bakterien), DNA (Viren)
TLR10	-	+		+	unbekannt

**Tabelle 1: Expression und Liganden von TLR:** Bisher sind beim Menschen zehn TLR bekannt. TLR sind in verschiedenen Immunzellen und Epithelzellen exprimiert [16,18]. Sie erkennen spezifische Bestandteile von Mikroorganismen (PAMPs) [19]. Ein TLR kann verschiedene, strukturell unterschiedliche Liganden binden. Die Maus besitzt noch einen weiteren TLR, TLR11. Dieser erkennt einen noch nicht identifizierten Bestandteil von uropathogenen Bakterien [19].

TLR sind membrangebundene Glycoproteine. Sie sind sowohl in der Zellmembran (TLR1, 2, 5, 6) als auch intrazellulär in den Membranen von Lysosomen / Endosomen (TLR7, 8, 9) zu finden [19]. TLR3 und 4 können, je nach Zelltyp, in der Zellmembran oder intrazellulär

lokalisiert sein. Nach Bindung eines Liganden dimerisiert der TLR und die Signaltransduktion beginnt mit Bindung eines Adapterproteins (Abb. 2). Je nach TLR gibt es vier verschiedene Adapterproteine: MyD88, TIRAP, TRIF und TRAM. Je nachdem ob MyD88 an der Signalkaskade beteiligt ist, werden die sich anschließenden Signalwege MyD88 abhängiger Signalweg und MyD88 unabhängiger Signalweg genannt. Den MyD88 abhängigen Signalweg können alle TLR außer TLR3 aktivieren. Er führt über mehrere Kinasen schließlich zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B wandert in den Kern und führt als Transkriptionsfaktor zur Transkription von verschiedenen Effektorproteinen des angeborenen Immunsystems, wie proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8) und antimikrobiellen Peptiden (z.B. hBD-2). Der MyD88 unabhängige Signalweg führt über Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3 zur Transkription von IFN- $\beta$  und IFN- $\beta$  induzierbarer Gene (z.B. IP-10) sowie zu einer späten NF- $\kappa$ B Aktivierung [19]. Der MyD88 unabhängige Signalweg wurde bisher nur für TLR3 und TLR4 beschrieben, wobei TLR3 ausschließlich den MyD88 unabhängigen Signalweg benutzt.



**Abb. 2: Signalwege der TLR:** TLR befinden sich in der Zellmembran und der Membran von Endosomen. Bei Kontakt mit ihren Liganden dimerisieren sie und binden eins von vier verschiedenen Adaptermolekülen. Das Signal wird weitergegeben und führt schließlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Die wichtigsten Adaptermoleküle sind MyD88, das zur Transkription NF- $\kappa$ B regulierter Gene führt, und TRIF, das über Aktivierung von IRF3 zur Transkription von IFN- $\beta$  und IFN- $\beta$  induzierbarer Gene führt.

Nicht nur Zellen der angeborenen Immunantwort, sondern auch B Zellen, einige T-Zellen, Fibroblasten und viele Epithelien exprimieren TLR. Epithelzellen können so unabhängig von Immunzellen Bakterien erkennen und durch Ausschüttung von Zytokinen und AMP zum Abtöten der Bakterien und der Rekrutierung von Immunzellen beitragen. In Atemwegsepithel konnte die mRNA aller zehn TLR nachgewiesen werden (Tabelle 1) [18].

Pathogene, die es geschafft haben, ins Zytosol einzudringen, können von nicht Membran gebundenen, zytoplasmatischen PRR erkannt werden. Dazu gehören die NOD-LRR Proteine, die bakterielle Bestandteile erkennen, und die CARD-Helikase Proteine, die virale Komponenten erkennen [19].

### **2.1.3 Antimikrobielle Peptide**

Außer den beschriebenen Zellen, gehören eine Vielzahl von löslichen Proteinen und Peptiden zum angeborenen Immunsystem. Wichtiger Bestandteil sind die Proteine der Komplementkaskade, die durch Antigen-Antikörper Komplexe und Bakterienbestandteile aktiviert wird, und an deren Ende Proteine stehen, die eine Entzündung auslösen, chemotaktisch für Immunzellen sind und die Bakterien direkt lysieren oder durch Opsonierung für Immunzellen zur Phagozytose markieren.

Zu den löslichen Bestandteilen gehören außerdem die AMP. Als AMP bezeichnet man allgemein alle Peptide des Wirtsorganismus mit antimikrobieller Aktivität, d.h. Peptide, die Mikroorganismen abtöten oder in ihrem Wachstum inhibieren können. Sie werden von einer Vielzahl von Zellen gebildet, haben unterschiedliche Strukturen und unterscheiden sich in ihrer Funktionsweise und ihren Zielorganismen. AMP sind evolutionsgeschichtlich sehr alt und wurden in Tieren, Pflanzen und Bakterien gefunden. Es gibt verschiedene Kriterien nach denen AMP in Gruppen eingeteilt werden. Man kann AMP nach ihrer Größe, Struktur und Zusammensetzung der Aminosäuren unterteilen. Aufgrund der enormen Vielzahl an AMP und immer neuen Peptiden mit antimikrobieller Aktivität, die gefunden werden, gibt es bisher noch keine einheitliche Klassifizierung.

Die meisten AMP üben ihre antimikrobielle Aktivität über Interaktion mit der bakteriellen Zellmembran, was schließlich zu Instabilität und Lyse der Bakterie führt, aus. Die Selektivität der AMP für prokaryotische Zellen scheint an der unterschiedlichen Zusammensetzung von prokaryotischer und eukaryotischer Zellmembran zu liegen. An der ersten Bindung des

Peptids an die Zielzelle sind elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen AMP und den negativ geladenen Molekülen der bakteriellen Zellwand beteiligt. Der genaue Mechanismus der dann folgenden Interaktion der Peptide mit der bakteriellen Zellmembran ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Die gängigsten Theorien gehen davon aus, dass mehrere Peptide einen stabilen Kanal bilden oder unstrukturierte Aggregate in der Zellmembran, aus denen sich spontan und kurzfristig Poren bilden [20]. Einer dritten Theorie zufolge bedecken die Peptide die Bakterienmembran großflächig, was die Integrität der bakteriellen Membran stört und schließlich zu Löcherbildung führt [21]. In allen drei Theorien führen die sich bildenden Löcher oder Kanäle schließlich zum Verlust von intrazellulären Bestandteilen.

AMP von Wirbeltieren besitzen neben ihrer antimikrobiellen Aktivität häufig auch die Eigenschaften von Entzündungsmediatoren und können auf vielfältige Art und Weise die Immunantwort beeinflussen. Im Respirationstrakt findet man eine Vielzahl an AMP, darunter die Defensine und Cathelizidine [9]. Sie werden von verschiedenen Zelltypen gebildet und ins Atemwegssekret abgegeben.

### ***Defensine***

Als Defensine bei den Wirbeltieren werden kationische Peptide mit sechs Cysteinen, die drei charakteristische intramolekulare Disulfidbrücken bilden, bezeichnet. Sie haben eine molekulare Größe von 3,5 bis 4,5 kD und sind reich an den positiv geladenen Aminosäuren Lysin und Arginin. Aufgrund der unterschiedlichen Verknüpfung der Cysteine zu Disulfidbrücken und der allgemeinen molekularen Struktur werden  $\alpha$ -Defensine,  $\beta$ -Defensine und  $\theta$ -Defensine unterschieden.

Bei den  $\alpha$ -Defensinen unterscheidet man die  $\alpha$ -Defensine 1 bis 4, die auch neutrophile Granulozyten Peptide 1-4 genannt werden, da sie in großen Mengen in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten vorkommen, von den  $\alpha$ -Defensinen 5 und 6, die epithelialen Ursprungs sind. Im Respirationstrakt konnten die  $\alpha$ -Defensine 1 bis 4 nachgewiesen werden, die von in den Respirationstrakt eingewanderten neutrophilen Granulozyten abgegeben werden [22]. Die  $\alpha$ -Defensine 5 und 6 wurden hingegen bisher nur in Darm und Auge gefunden [23,24].

Bisher konnte die Expression von vier  $\beta$ -Defensinen im Respirationstrakt nachgewiesen werden.  $\beta$ -Defensin 1 wird konstitutiv von Atemwegsepithelzellen gebildet und sekretiert



[25]. Die Expression der  $\beta$ -Defensine 2 bis 4 wird dagegen durch Infektion und Entzündung induziert [26-28].

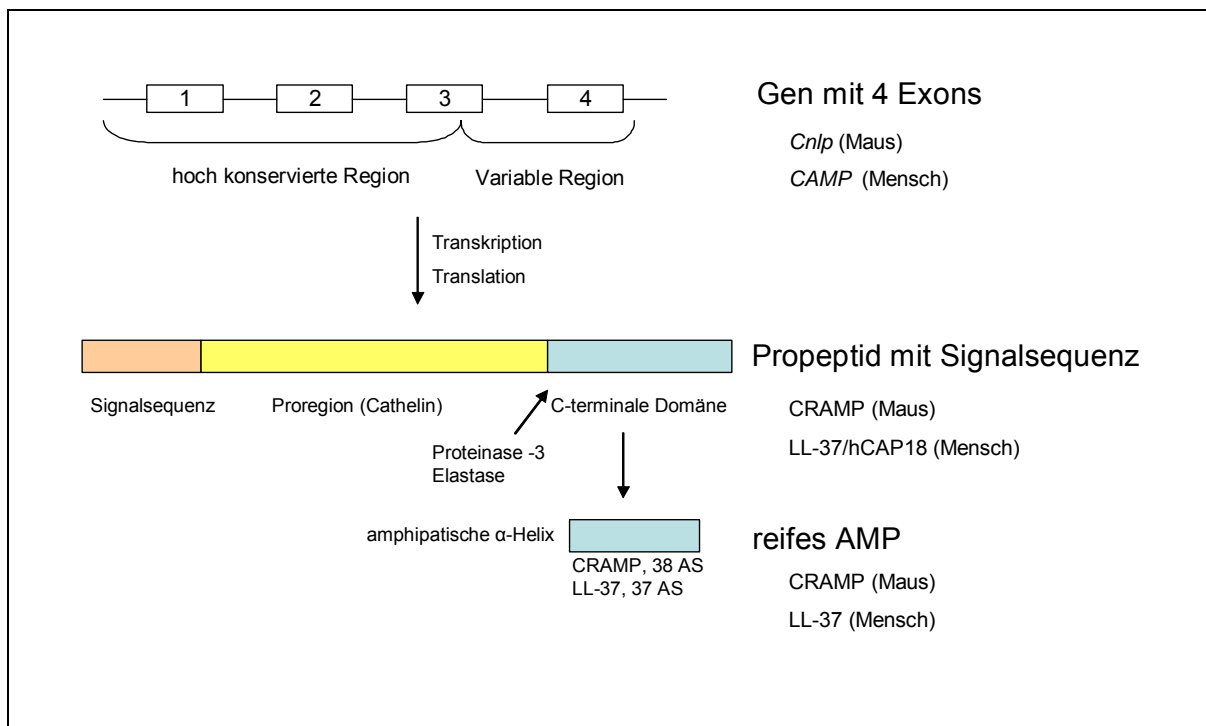
Der dritte Defensintyp,  $\theta$ -Defensin, ist bei Mensch und Maus nicht bekannt und wurde bisher nur aus den neutrophilen Granulozyten von Rhesusaffen isoliert [29].

### ***Cathelizidine***

Der Name Cathelizidin leitet sich von der Cathelin (= Cathepsin L Inhibitor) genannten Proregion dieser AMP ab. Diese ist durch viele Spezies hindurch hoch konserviert und ein Inhibitor der Proteinase Cathepsin L [30]. Außerdem besitzt sie antimikrobielle Aktivität [30]. Weiterhin bestehen Cathelizidine noch aus einer Signalsequenz und einer C-terminalen Domäne, deren Aminosäuresequenz in verschiedenen Spezies äußerst heterogen ist (Abb. 3). Diese C-terminale Domäne stellt das eigentliche AMP dar, ist zwischen 12 und 80 Aminosäuren groß und enthält viele positiv geladene Aminosäuren. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus ist nur ein Cathelizidin bekannt. Obwohl die Aminosäuresequenzen der C-terminalen Domänen beider Spezies nicht homolog sind, enthalten beide Peptide viele kationische Aminosäuren, bilden beide eine amphipatische  $\alpha$ -Helix und besitzen ein ähnliches Wirkungsspektrum [31-33]. Man kann sie deswegen als strukturhomolog bezeichnen. Das humane Cathelizidin heißt LL-37/hCAP18. Das geschnittene, reife AMP wird LL-37 genannt, da es 37 Aminosäuren lang ist und mit zwei L(ysinen) beginnt. Das Protein inklusive Cathelin Proregion ist 18 kDa groß, daher der Name LL-37/hCAP18 (Abb. 3). LL-37/hCAP18 wird hauptsächlich in neutrophilen Granulozyten gebildet, wo es als Propeptid in den spezifischen Granula gespeichert wird [32]. Außerdem wird es von anderen Immunzellen, wie Makrophagen und Lymphozyten, sowie einigen Epithelien synthetisiert [34-40]. In neutrophilen Granulozyten signalisiert die Signalsequenz bei der Synthese im ER, dass das Protein für den Export bestimmt ist. Die Signalsequenz wird abgespalten und das Protein wird als Propeptid in den spezifischen Granula gespeichert. Erst bei Sekretion der Granula wird das Propeptid extrazellulär durch die mit abgegebene Protease 3 geschnitten, wodurch Cathelin und das aktive LL-37 entstehen [41]. Es ist bisher nicht bekannt, wie LL-37/hCAP18, das in anderen Zelltypen synthetisiert wird, prozessiert wird. In den Atemwegen wird LL-37/hCAP18 von Immunzellen und Epithelzellen gebildet und in das Atemwegssekret abgegeben [37]. Es kann in Lungenspülungen nachgewiesen werden [42].

Das Cathelizidin der Maus heißt CRAMP (cathelin-related antimicrobial peptide). Das reife AMP ist 38 Aminosäuren groß und hat eine ähnliche Struktur wie LL-37 [43]. Nach den bisherigen Erkenntnissen gleicht es auch in der Funktion LL-37. Die Expression von CRAMP wurde bisher in neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Knochenmark, Darmepithel, Haut und einigen Organen, wie Milz, Magen und Darm nachgewiesen [33].

Auch die Gene von LL-37/hCAP18 (*CAMP*) und CRAMP (*Cnlp*) sind ähnlich aufgebaut. Sie bestehen aus vier Exons, wobei sich die Sequenz für das geschnittene AMP in Exons 3 und 4 befindet (Abb. 3). Zur Herstellung einer CRAMP KO Maus wurden die Exons 3 und 4 mittels gerichteter Rekombination durch eine Neomycin Resistenz ersetzt [44]. Dadurch wird die Expression von CRAMP vollständig verhindert. Bei Haltung der Mäuse in einer Pathogen freien Umgebung konnte bisher kein Phänotyp entdeckt werden [44].



**Abb. 3: Struktur der Cathelizidine LL-37/hCAP18 und CRAMP:** Alle Cathelizidine sind ähnlich aufgebaut: Das Gen besitzt vier Exons; das daraus entstehende Präproprotein besteht aus einer zwischen den Spezies hoch konservierten Signalsequenz und Cathelin Proregion sowie einer variablen C-terminalen Domäne, dem späteren AMP. Das reife Peptid mit antimikrobieller Wirkung entsteht durch proteolytische Spaltung des Propeptids in Cathelin und AMP (LL-37 / CRAMP).

## 2.2 Funktionen von LL-37 und CRAMP

### 2.2.1 Antimikrobielle Aktivität

Chemisch synthetisiertes oder aus Zellen aufgereinigtes LL-37 und CRAMP wirken *in vitro* auf eine Vielzahl von Mikroorganismen toxisch (Tab. 2). Am empfindlichsten zeigten sich einige gramnegative Bakterien, wie *E. coli* und *P. aeruginosa*. Bei ihnen liegt die minimale inhibitorische Konzentration (MIK) zwischen 2,5 und 20 µg/ml Cathelizidin. Gegenüber höheren LL-37 bzw. CRAMP Konzentrationen zeigten sich auch einige grampositive Bakterien empfindlich (Tab. 2). LL-37 besitzt zusätzlich auch antivirale Aktivität gegen Herpes Simplex Virus und Adenovirus [45]. Dagegen war der Pilz *Candida albicans* auch gegenüber hohen Cathelizidin Konzentrationen unempfindlich (Tab. 2). Eine neuere Studie zeigte jedoch, dass bei extrem niedrigen Salzkonzentrationen Cathelizidine auch gegen *C. albicans* toxisch wirken [46].

Generell ist die antimikrobielle Aktivität von Cathelizidinen stark von der Salzkonzentration abhängig [33,47,48]. Bei Experimenten zur antimikrobiellen Aktivität von CRAMP in unserem Labor wurde bei hohen Salzkonzentrationen ein Ausfallen von Kristallen beobachtet, das mit dem Verschwinden der antimikrobiellen Aktivität einherging (nicht publizierte Daten). Die meisten Bakterien zeigen sich schon bei einer NaCl Konzentration von 100 mM deutlich resistenter gegenüber CRAMP und LL-37 [48]. In der Anwesenheit von zweiwertigen Kationen wie  $Mg^{2+}$  oder  $Ca^{2+}$  wird die antimikrobielle Aktivität von Cathelizidinen noch stärker inhibiert [49]. Diese inhibitorischen Salzkonzentrationen sind jedoch im physiologischen Bereich, was lange Zeit einen Widerspruch zur postulierten antimikrobiellen Funktion der Cathelizidine darstellte [49]. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass AMP auch bei physiologischen NaCl Konzentrationen aktiv sind, wenn Carbonat Ionen ( $CO_3^{2-}$ ) vorhanden sind [50]. Carbonat führt zu Veränderungen in der Zellwand von Bakterien, was diese für AMP empfindlich macht. Außer Salzen können auch große anionische Moleküle die Aktivität von kationischen AMP beeinflussen. LL-37 bindet an verschiedene, negativ geladene Makromoleküle und verliert dadurch die antimikrobielle Aktivität. Dies konnte bisher für DNA [51], F-Aktin [51], bakterielle Exopolysaccharide wie Alginat [52], Mucin [53] und Glycosaminglykane aus Wundflüssigkeit [54] gezeigt werden. Die Vielfalt an inhibitorischen Makromolekülen wirft die Frage auf, in wie weit die antimikrobielle Aktivität von LL-37 und CRAMP an Infektionsherden vorhanden ist und zur Bekämpfung der Infektion beiträgt.

Mikroorganismus	MIK (LL-37) [µg/ml]	MIK (CRAMP) [µg/ml]
<i>E. coli</i> (gram-)	2,5 - 32	2,5 - 10
<i>P. aeruginosa</i> (gram-)	4 - 16	3 - 20
<i>S. typhimurium</i> (gram-)		40
<i>B. megaterium</i> (gram+)		20
<i>S. epidermidis</i> (gram+)	44	80
<i>S. faecalis</i> (gram+)		80
<i>S. aureus</i> (gram+)	5 - 32	10 - >300
<i>E. faecalis</i> (gram+)	32	
<i>Candida albicans</i>	>250	>300

**Tabelle 2: MIK von synthetischem LL-37 und CRAMP für einige ausgewählte Mikroorganismen [33,37,47,48].** Gramnegative (gram-) Bakterien zeigen sich empfindlich gegenüber der antimikrobiellen Aktivität von LL-37 und CRAMP. Grampositive (gram+) Bakterien und Pilze zeigen sich wenig bis gar nicht empfindlich. Die MIK für ein Bakterium ist nicht nur vom verwendeten Stamm, sondern auch stark von den Versuchsbedingungen (z. B. Salzkonzentration) und der Art des antimikrobiellen Assays abhängig [48].

Dass CRAMP und LL-37 tatsächlich als antimikrobielle Substanzen in vivo von Bedeutung sind, wurde durch ex vivo Daten und einige Tierexperimente untermauert. In Samenflüssigkeit wurden große Mengen an LL-37/hCAP18 (40 – 140 µg/ml) gefunden [40]. LL-37/hCAP18 ist dort an die Spermien gebunden. Im sauren Milieu der Vagina wird es durch Gastricin zu ALL-38, einer um eine Aminosäure längeren Variante von LL-37 mit gleicher antimikrobieller Aktivität, gespalten [55]. Es wird vermutet, dass dieses den Vaginaltrakt der Frau vor durch den Geschlechtsakt verursachten Infektionen schützt. Die wichtigsten Daten hinsichtlich der antimikrobiellen Aktivität von Cathelizidinen ex vivo und in vivo liefern aber Experimente mit CRAMP KO Mäusen. *Salmonella typhimurium* kann in Makrophagen von CRAMP KO Mäusen besser überleben als in Makrophagen von WT Mäusen [56]. In Makrophagen aus WT Mäusen wird die Teilung der Bakterien durch CRAMP und Proteasen verhindert. Auch Mastzellen aus CRAMP KO Mäusen hatten im Vergleich zu Mastzellen aus WT Mäusen eine verminderte Fähigkeit, Gruppe A Streptokokken abzutöten [57]. Verschiedene Infektionsexperimente mit CRAMP KO Mäusen lieferten Belege für die antimikrobielle Aktivität von CRAMP in vivo. CRAMP KO Mäuse

zeigten eine stärkere und langsamer abheilende Infektion der Haut nach Infektion mit Gruppe A Streptokokken [44]. Genauso hatten CRAMP KO Mäuse größere Schwierigkeiten mit einer *Citrobacter rodentium* Darminfektion als WT Mäuse [58]. Geringere Infektionsdosen führten zur Etablierung einer Infektion, und Kolonialisierung und Epithelschädigung war bei den KO Mäusen verstärkt. Außerdem wurde in einem bronchialen Cystische Fibrose Xenograft Modell gezeigt, dass die Überexpression von LL-37 mittels viralen Gentransfers zu einer Verstärkung der antimikrobiellen Aktivität des Atemwegssekrets führt [59].

Einige Mikroorganismen besitzen Resistenzen gegenüber CRAMP / LL-37, was indirekt auch für die antimikrobielle Aktivität der Peptide in vivo spricht. *Haemophilus influenzae* kann den Anteil an Phosphorylcholin in der Zellwand erhöhen, was zu einer verminderten Anfälligkeit gegenüber LL-37 führt [60]. Auch *P. aeruginosa* kann durch Veränderung eines Zellwandbestandteils seine Anfälligkeit gegenüber AMP verringern [61]. Bei *P. aeruginosa* aus der Lunge von Cystische Fibrose Patienten fand man LPS mit einem veränderten Lipid A Bereich, wodurch die Bakterien nicht mehr sensitiv auf kationische AMP reagierten. Bei *Staphylokokkus aureus* sind drei Gene bekannt, die Resistenz gegenüber kationischen AMP vermitteln. *mprF* führt zur Modifizierung von Phosphatidylglycerol mit positiv geladenem L-Lysin, was zu einer Abstoßung der ebenfalls positiv geladenen AMP führt [62]. Das zweite Resistenzgen ist *dltA*.  $\Delta dltA$  Mutanten haben veränderte Teichonsäure (ohne D-Alanin) in der Zellwand [63]. Auch hierdurch ist die Oberfläche der Bakterien weniger stark negativ geladen. *AmprF* und  $\Delta dltA$  Mutanten sind empfindlicher gegenüber der antimikrobiellen Aktivität von kationischen AMP als der Wildtyp Stamm. Außerdem produziert *S. aureus* das Exoprotein Staphylokinase. Staphylokinase induziert die Sekretion von  $\alpha$ -Defensinen aus neutrophilen Granulozyten, formt mit ihnen einen Komplex und inhibiert so ihre antimikrobielle Aktivität [64]. Eine Wirkung von Staphylokinase auf Cathelizidine ist bisher nicht bekannt.

Aufgrund ihrer Interaktion mit Biomembranen können Cathelizidine in höherer Konzentration auch für eukaryotische Zellen toxisch sein. Dabei zeigen besonders Cathelizidine mit C-terminalen oder N-terminalen hydrophoben Regionen, wie LL-37, Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen [65-67]. Besonders anfällig sind proliferierende Zellen, Tumorzellen und Erythrozyten [66]. Interessanterweise wird die Toxizität durch Serum vermindert oder sogar unterdrückt [68]. CRAMP zeigt dagegen keine Toxizität gegenüber Erythrozyten [33].

### **2.2.2 Modulation der Immunantwort**

Neben antimikrobieller Aktivität besitzen die meisten AMP noch weitere biologische Funktionen. Defensine z. B. sind an der Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen und komplexen Prozessen wie Wundheilung und Proliferation beteiligt [1,69]. Die immunmodulatorischen und -regulatorischen Funktionen von LL-37 und CRAMP sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

#### ***Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen***

LL-37 ist chemotaktisch für neutrophile Granulozyten, Monozyten und CD4<sup>+</sup> T-Zellen [70]. Die chemotaktische Aktivität wird durch Bindung an den G-Protein gekoppelten Rezeptor FPRL1 („formyl peptide receptor like 1“) auf den Zielzellen vermittelt. Auch CRAMP ist über Bindung an FPRL1 und das murine Homolog, FPR-2, chemotaktisch für humane und murine neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen [71]. Dies konnte auch in vivo durch den Einstrom von Neutrophilen und Monozyten nach Injektion von CRAMP belegt werden. Außer FPRL1 wurde auch P2X7 als Rezeptor für LL-37 identifiziert [72]. In Monozyten führt LL-37 über Bindung an den P2X7 Rezeptor zur Abgabe von IL-1 $\beta$ . In humanen Monozyten und bronchialen Epithelzellen wurde die Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2 und p38 durch LL-37 über einen G-Protein Rezeptor unabhängigen aber weiter noch nicht näher bekannten Mechanismus festgestellt, was zur Expression von IL-8 führte [73]. Zwei Studien zeigen, dass LL-37 die Zellmembran passieren kann und intrazellulär im Zytosol und Zellkern zu finden ist [74,75].

LL-37 beeinflusst die in vitro Differenzierung DZ aus Monozyten. DZ, die unter Anwesenheit von LL-37 generiert wurden, hatten eine erhöhte Endozytosekapazität, eine verstärkte Expression costimulatorischer Oberflächenmoleküle, eine erhöhte Abgabe von Zytokinen und führten zu verstärkter T-Zell Aktivierung [76].

### ***Einfluss auf Epithel-, Endothel- und Tumorzellen***

Des Weiteren sind Cathelizidine auch an Wundheilung, Reepithelialisierung, Proliferation, Apoptose und Tumorwachstum beteiligt. Erhöhte Konzentrationen von LL-37 wurden in sich schließenden Wunden bei in vitro und in vivo Wundmodellen der Haut detektiert [77]. In chronischen Wunden wurde dagegen eine verminderte LL-37 Konzentration festgestellt. In vitro ging die LL-37 Expression mit vermehrter Proliferation der Epithelzellen einher. Später wurde gezeigt, dass LL-37 über die Transaktivierung des EGF Rezeptors auch die Migration von Keratinozyten anregt [78]. In einem in vitro Wundmodell mit Lungenepithelzellen konnte der Wundschluss durch Zugabe von LL-37 beschleunigt werden [79]. Die Lungenepithelzellen zeigten bei Anwesenheit von LL-37 verstärkte Migration und Proliferation. An den Effekten von LL-37 waren der EGF Rezeptor, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor und MAP/ERK beteiligt. In einem in vitro Angiogenese Modell führte die Zugabe von LL-37 zu einer gesteigerten Proliferation von Endothelzellen und Bildung von gefäßähnlichen Strukturen [80]. Darüber hinaus zeigten CRAMP KO Mäuse eine verminderte Vaskularisierung von Wunden.

Es gibt jedoch nicht nur Hinweise auf die Induktion von Proliferation durch LL-37, sondern genauso zur Induktion von Apoptose. In einer Studie wurde gezeigt dass LL-37 in zwei Lungenepithelzelllinien in vitro caspaseabhängig Apoptose auslöst [81]. Auch in vivo, bei Applikation von LL-37 in die Lunge von Mäusen, fanden die Forscher Apoptose von Epithelzellen. Interessant war, dass die Apoptose Induktion durch humanes Serum verhindert wurde. Einer anderen Studie zufolge unterdrückt LL-37 aber die Apoptose von Neutrophilen [82]. Dies geschieht vermutlich unter Beteiligung der beiden bekannten Rezeptoren für LL-37, FPRL1 und P2X7. Beobachtet wurde die Phosphorylierung von ERK1/2, Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-x(L) und Inhibierung der Caspase 3.

LL-37 wurde auch mit Tumorwachstum in Verbindung gebracht. Allerdings gibt es auch hier unterschiedliche, teilweise widersprüchlich erscheinende Daten. Da einige Studien gezeigt haben, dass epitheliale Zelllinien durch die Zugabe von LL-37 oder Transfektion mit LL-37 zu verstärkter Proliferation angeregt werden, wird eine Beteiligung von LL-37 am Tumorwachstum diskutiert. In einer Studie mit Mammakarzinomen wurde eine stark erhöhte Expression von LL-37 in den Tumorzellen gefunden [83]. In zwei anderen Studien wurde dagegen eine verminderte Expression von LL-37 in Leukozyten von Leukämie Patienten nachgewiesen [84,85]. In wieder anderen Tumormodellen konnte in vitro und in vivo Apoptose durch LL-37 induziert werden. In einer oralen Adenokarzinomzelllinie wurde



Apoptose durch Zugabe von LL-37 caspaseunabhängig durch Depolarisation der mitochondrialen Membran induziert [86].

### ***Bindung von LPS und LPS neutralisierende Wirkung***

Schon lange ist bekannt, dass Cathelizidine LPS binden können [87,88]. Dies führt dazu, dass die Expression von proinflammatorischen Zytokinen auf mRNA und Protein Ebene in Makrophagenzelllinien, die in vitro mit LPS und LL-37 inkubiert werden, unterdrückt wird [89]. In vivo wurde die Bedeutung von Cathelizidinen als LPS bindende Peptide durch Inhibierung von Sepsis bestätigt. In einem letalen LPS Sepsismodell in Mäusen verhinderte die Injektion von LL-37 oder einem Peptid, das nur aus dem LPS bindenden Bereich von LL-37/hCAP18 bestand, das Sterben der Mäuse [89,90]. Auch systemische Überexpression von LL-37 durch viralen Gentransfer erhöhte die von der Maus tolerierten LPS Mengen und schützte vor septischem Schock [91]. Wie genau LL-37 die Bindung von LPS an seine Rezeptoren verhindert, war lange unklar. Kürzlich hat sich eine Studie damit genauer beschäftigt und kam zu dem Ergebnis, dass LL-37 über verschiedene Mechanismen die Bindung von LPS an TLR4 verhindert [92]. Demnach kann LL-37 LPS binden und zwar sowohl lösliches LPS, wobei es dabei LPS Aggregate auflöst, als auch schon an die Zelloberfläche gebundenes LPS. Dadurch verhindert LL-37 die Bindung von LPS an das Transportprotein LBP bzw. an seine Rezeptoren CD14 und TLR4. LPS-LL-37 Komplexe werden sogar auch in der Zelle gefunden. Außerdem kann LL-37 selber an CD14 binden und LPS kompetitiv von CD14 verdrängen [93,94]. Die Autoren vermuten, dass das reine Fernhalten des LPS von seinem Rezeptor eventuell nicht der einzige Effekt von LL-37 ist. Dafür sprechen auch neue Daten, die zeigen, dass die Unterdrückung der Immunantwort von Makrophagen auf LPS durch LL-37 selektiv nur auf Gene beschränkt war, die zu Sepsis führen können [95]. Die Expression von Genen, die für Zellrekrutierung und Zellbewegung benötigt werden, war nicht beeinträchtigt. Eine andere Gruppe zeigte, dass LL-37 die Zytokin- und NO Produktion von Makrophagen auf LPS unterdrückt, nicht jedoch die Produktion von RSS [96]. Die RSS Produktion wurde durch LPS angeregt und durch Zugabe von LL-37 noch verstärkt. Die Autoren postulieren, dass die LPS-LL-37 Komplexe TLR4 unabhängig Signale weiterleiten können. Kürzlich wurde gezeigt, dass LL-37 auch die Aktivierung von Makrophagen durch TLR2 und TLR9 Liganden verhindert [95]. Über die Auswirkungen der Bindung von LPS durch CRAMP ist bisher nichts bekannt.



### 2.2.3 Regulation der Expression von LL-37 und CRAMP

Während neutrophile Granulozyten Cathelizidine in den spezifischen Granula in großen Mengen gespeichert haben und bei Bedarf ausschütten können, scheint die Expression von LL-37 / CRAMP in Epithelzellen und Makrophagen zumindest teilweise induzierbar. In einigen Studien wurde gezeigt, dass Bakterien, bakterielle Bestandteile oder Entzündung die Produktion und Sekretion von LL-37 und CRAMP anregen [38,56]. In Epithelzellen des oberen Respirationstrakts kann die Expression von LL-37/hCAP18 durch LPS und LTA in vitro induziert werden [97]. Im Gegensatz dazu wurde eine in vitro Induktion von LL-37/hCAP18 in Epithelzellen des unteren Respirationstrakts bisher nicht beobachtet.

Im Gegensatz zu bakteriellen Produkten und Th1 Zytokinen wirken Th2 Zytokine inhibierend auf die Expression von Defensinen und Cathelizidinen. In einer Studie wurde die Expression von LL-37 bei zwei Hautkrankheiten verglichen. Wogegen bei der Th1 dominierten Psoriasis erhöhte Konzentrationen von LL-37 gemessen wurden, waren die LL-37 Werte bei der Th2 dominierten atopischen Dermatitis stark vermindert [98]. In einem murinen Asthmamodell konnten wir zeigen, dass die asthmatische Entzündung zu einer verminderten Abgabe von CRAMP führt. Bei gleichzeitiger bakterieller Infektion in der Lunge führte dies zu einer verlangsamten Klärung der Bakterien [99]. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei atopischer Dermatitis mit gleichzeitiger Virusinfektion gefunden [100].

Auch im Frühstadium von *Shigella* Infektionen des Gastrointestinaltrakts wurde eine verminderte Expression von LL-37 und  $\beta$ -Defensin 1 gefunden [101]. Die Autoren spekulieren, dass *Shigella* Plasmid DNA diesen Effekt hervorruft.

## 2.3 Infektionen der Atemwege und Bedeutung der angeborenen Immunität bei der Klärung der Infektion

### 2.3.1 Akute Infektion

Häufigste Todesursache unter allen Infektionskrankheiten ist die Lungenentzündung. Häufigster Erreger einer Lungenentzündung ist *Streptococcus pneumoniae*, aber auch eine ganze Reihe anderer Bakterien wie *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella*

*pneumophila* und Viren wie das Respiratorische Syncytial Virus können eine Pneumonie hervorrufen [102,103].

Die Komponenten des angeborenen Immunsystems tragen wesentlich zur Klärung einer akuten Pneumonie bei [104]. Makrophagen und neutrophile Granulozyten phagozytieren und töten Mikroorganismen, die in die Lunge gelangt sind. Makrophagen sind außerdem durch die Abgabe von Zytokinen und Chemokinen an der Initiierung und Regulation der Entzündung sowie der Rekrutierung und Aktivierung von weiteren Immunzellen beteiligt [12]. Für die Erkennung von Mikroorganismen sind PRR, wie TLR und Surfactantproteine auf der Oberfläche von Immunzellen von zentraler Bedeutung. Durch Infektionsstudien mit KO Mäusen wurde gezeigt, dass das Fehlen eines einzigen PRR, wie TLR4 [105,106] oder Surfactantprotein A [107] zu einer verminderten Infektionsabwehr führt. Einige Untersuchungen zeigen erhöhte Konzentrationen von AMP bei Infektionen des Respirationstrakts. In den Lungenspülungen von Neugeborenen und Erwachsenen mit Lungenentzündung wurden erhöhte Konzentrationen an LL-37/hCAP18 und  $\beta$ -Defensinen detektiert [108,109]. Deswegen geht man davon aus, dass auch AMP an der Klärung einer akuten Infektion beteiligt sind, allerdings konnte dies in vivo noch nicht gezeigt werden.

### **2.3.2 Cystische Fibrose als Beispiel einer chronischen Entzündung**

Cystische Fibrose oder Mukoviszidose ist eine genetisch bedingte Stoffwechselerkrankung, die stets mit einer chronischen Infektion der Lunge einhergeht. Mukoviszidose wird durch eine Mutation im Gen eines Chloridkanals (CFTR; „Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator“) ausgelöst [110]. Die Mutation führt zu einer gestörten Kanalfunktion. Dies hat eine zähflüssige Schleimschicht auf dem Lungenepithel zur Folge, welche durch das Flimmerepithel nicht richtig abtransportiert werden kann und einen Nährboden für zahlreiche Bakterien bildet. Mukoviszidose führt schon im frühen Alter zu einer chronischen Infektion des Respirationstrakts. Im Verlauf der Erkrankung kommt es meist zu Infektionen mit dem Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* [111]. In den Lungen von Cystische Fibrose Patienten findet man aber auch viele weitere Mikroorganismen wie z. B. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* und die Pilze *Candida albicans* und *Aspergillus fumigatus* [112]. Oft sind die Lungen mit mehreren Bakterien gleichzeitig infiziert, die organisierte Strukturen wie Biofilme bilden können [113].

Besonders die angeborene Immunantwort ist bei Cystische Fibrose Patienten geschwächt und führt durch die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen obendrein zu einer anhaltenden Entzündung [114-116]. Neutrophile Granulozyten strömen zwar in großer Anzahl an den Infektionsherd, können die Bakterien jedoch nur in ungenügender Weise abtöten. Dagegen tragen die im zähen Schleim befindlichen toten neutrophilen Granulozyten und die Entzündungsmediatoren, die sie sowohl vor als auch nach ihrem Tod frei geben, zu einem großen Teil zur Entstehung und Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung bei, wobei die Klärung der Zelltrümmer durch den zähen Schleim stark erschwert ist [117]. Auch die Aktivität AMP ist bei Cystischer Fibrose gestört. So können AMP wie Defensine und LL-37/hCAP18 in erhöhten Konzentrationen in Lungenspülungen und Sputum von Cystische Fibrose Patienten nachgewiesen werden [118,119]. Im Fall von LL-37/hCAP18 hatten Patienten mit stärkerer Entzündung und schlechterer Lungenfunktion höhere Level an LL-37 in der Lungenspülung als Patienten, denen es besser ging [120]. Trotz erhöhter Konzentrationen an AMP zeigte sich jedoch, dass die antimikrobielle Aktivität des Atemwegssekrets vermindert ist [121]. Zur verminderten Aktivität der AMP kommt noch, dass diese im Atemwegssekret von Cystische Fibrose Patienten in so hohen Konzentrationen vorliegen, dass sie auch für körpereigene Zellen toxisch sind [119]. So könnten die hohen AMP Konzentrationen, genau wie die neutrophilen Granulozyten, eher zur Verstärkung der Entzündung und Epithelschädigung als zur Klärung der Infektion beitragen. Der Grund für die verminderte antimikrobielle Aktivität des Atemwegssekrets sowie die genauen Ursachen für das generelle Unvermögen des Immunsystems, die Bakterien zu eliminieren, sind noch nicht geklärt. Auch wenn die Behandlung von Cystische Fibrose Patienten in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht hat, sind die bakteriellen Infektionen des Respirationstrakts immer noch schwer therapierbar [122].

## 2.4 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktionen der humanen und murinen AMP, LL-37/hCAP18 und CRAMP, bei einer bakteriellen Infektion des Respirationstrakts zu untersuchen.

In den letzten Jahren zeigte sich, dass das humane Cathelizidin LL-37/hCAP18 neben seiner antimikrobiellen Aktivität noch zahlreiche weitere Eigenschaften besitzt. So zeigen in vitro Studien, dass LL-37 chemotaktisch für Immunzellen ist und deren Aktivität modulieren kann. Darüber hinaus scheint LL-37 aber auch an so komplexen Vorgängen wie Wundheilung und Tumorwachstum beteiligt zu sein.

Durch Analyse von Proben von Patienten mit Lungenerkrankungen weiß man, dass LL-37/hCAP18 während einer Infektion oder Entzündung der Lunge vermehrt abgegeben wird. Die Auswirkungen dieser hohen LL-37/hCAP18 Konzentration und die Frage, ob LL-37 antimikrobielle oder immunmodulatorische Funktionen übernimmt, sind bisher noch weitgehend unklar.

In dieser Arbeit sollte deswegen die Funktion von Cathelizidinen bei einer Infektion des unteren Respirationstrakts untersucht werden. Zunächst sollte ein Infektionsmodell mit WT Mäusen etabliert werden, um zu zeigen, dass die Expression von CRAMP im Respirationstrakt, ebenso wie die Expression von LL-37/hCAP18 beim Menschen, während einer bakteriellen Infektion erhöht ist. Als nächstes sollten verschiedene Funktionen von LL-37 und CRAMP in vitro und in vivo untersucht werden. Hierfür wurden auch CRAMP KO Mäuse, bei denen das Gen für das murine Cathelizidin, CRAMP, zerstört ist, eingesetzt. Zunächst wurde die antimikrobielle Aktivität von CRAMP in vitro und in vivo bei Klärung einer bakteriellen Infektion der Lunge untersucht und zwischen WT und CRAMP KO Mäusen verglichen. Als nächstes sollte die immunmodulatorische Aktivität von LL-37 und CRAMP auf verschiedene Immunzellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten und DZ) näher betrachtet werden. Ein Schwerpunkt wurde hier auf den Einfluss von LL-37 auf die Aktivierung von DZ durch verschiedene TLR Liganden gelegt. Schließlich sollten auch die immunmodulatorischen Funktionen von CRAMP in vivo untersucht werden. Hierfür wurden Immunzellen aus WT und CRAMP KO Mäusen isoliert und verglichen. Außerdem wurden WT und CRAMP KO Mäuse in einem chronischen Infektionsmodell der Lunge und in zwei Sepsis Modellen verglichen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Zellkultur, Bakterien, Antikörper, Peptide

Alle Zellkulturmedien, fötales Kälberserum (FCS), Glutamin, Pyruvat und nicht essentielle Aminosäuren wurden von Gibco (Karlsruhe) bezogen. Alle Medien für die Bakterienkultur stammten von Roth (Karlsruhe) und PBS von PAA (Cölbe). Die murine Lungenepithelzelllinie LA-4 wurde in Ham F-12 Medium, 15 % FCS, 2 mM L-Glutamin angezogen. Die murinen Makrophagenzelllinien RAW 264.7 und J774 wurden in DMEM, 10 % FCS kultiviert. Die humanen Makrophagenzelllinien U-937 und Mono Mac 6 wurden in RPMI, 10 % FCS gehalten. Alle humanen und murinen Zellen wurden in einem Zellinkubator bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. *P. aeruginosa* PAO 1 und *E. coli* J96 und *E. coli* CP9 wurden in LB Medium angezogen. *S. aureus* 113 wt, *Δ dltA* und *Δ mprF* (alle drei von Dr. A. Peschel, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt) sowie *M. catarrhalis* (Dr. J. Seybold, Charité Berlin) wurden in CASO Bouillon + 3 % Hefeextrakt bzw. in Hirn-Herz-Glukose Bouillon angezogen. Alle diese Bakterien wurden unter Schütteln bei 37°C über Nacht angezogen, dann überimpft und bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 geerntet. Sie wurden einmal mit PBS gewaschen und in der gewünschten Konzentration in PBS aufgenommen. *P. aeruginosa* NH57388A und NH57388C wurden von Dr. Niels Hoiby (Universität Kopenhagen, Dänemark) zur Verfügung gestellt. Die Bakterien wurden in LB Medium + 1 % Glycerol unter Schütteln bei 37 °C für 18-24 Stunden kultiviert, auf OD<sub>600</sub> = 0,5 verdünnt, 30 Minuten bei 4°C und 14000 upm abzentrifugiert und im gewünschten Volumen des abzentrifugierten Überstands wieder gelöst. *S. pneumoniae* PN36 (Dr. M. Witznath, Charité Berlin) wurde auf Blutagarplatten über Nacht bei 37 °C angezogen, dann in CASO Bouillon + 3 % Hefeextrakt + 10 % FCS in einem offenem 50 ml Röhrchen stehend ohne Schütteln bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,3 angezogen. Die Bakterien wurden bei 3100 upm für 10 Minuten ohne Bremse abzentrifugiert und das Pellet in PBS resuspendiert. *S. pneumoniae* wurde auf Blutagarplatten ausgestrichen, alle anderen Bakterien auf LB Agarplatten.

Ein Kaninchen Antiserum gegen CRAMP sowie das entsprechende Präimmunserum wurden von Pineda-Antikörper-Service (Berlin) bezogen. CRAMP (ISRLAGLLRKGGEKIGEKLK KIGQKIKNFFQKLVPQPE-COOH), LL-37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRN

LVPRTES-COOH) und sLL-37 (RSLEGTD RFPFVRLKNSRKLEFKDIKGIKREQFVKIL-COOH) wurden von Dr. Peter Henklein (Charité Berlin) synthetisiert.

Als LPS wurde LPS von *Salmonella abortus equi* verwendet (Sigma-Aldrich; München). Alle Chemikalien stammten von Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt).

### 3.2 Mäuse

Für die Tierversuche wurden Mäuse des Stamms SvJ/129 verwendet. CRAMP KO Mäuse wurden von Dr. R. Gallo (University of California San Diego, USA) bezogen. Das Gen für CRAMP ist in diesen Mäusen durch Insertion einer Neomycin Resistenz (PGK-neo) zerstört [44]. Mit den erhaltenen Mäusen wurde eine Zucht für SvJ/129 WT und CRAMP KO Mäuse aufgebaut. Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte durch Isolation von DNA aus den Schwanzspitzen und Analyse des CRAMP Gens durch PCR. Dafür wurden das REDExtract-N-Amp Tissue PCR Kit von Sigma-Aldrich (München) und folgende Primer verwendet: 5'-TGTTTTCTCAGATCCTTGGGAGC-3' und 5'-AATTTTCTTGAACCGAAAGGGC-3' für das WT Gen und 5'-CCAGGGACTTCCATCCAGTAGAC-3' und 5'-AGACTGCCTTGGGAAAAGCG-3' für das KO Gen (TIB Molbiol; Berlin) [44]. Die Mäuse wurden unter SPF („specific pathogen free“) Bedingungen im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrums der Philipps-Universität Marburg gehalten und erhielten endotoxinfreies Standardfutter. Für die Infektions- und Sepsisversuche wurden sowohl Männchen wie auch Weibchen im Alter zwischen zwei und vier Monaten verwendet. In jedem einzelnen Versuch wurden nur Mäuse eines Geschlechts, mit einem Altersunterschied von nicht mehr als zwei Wochen verwendet. Für die Isolation von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten aus der Bauchhöhle wurden Mäuse im Alter von bis zu einem Jahr verwendet.

### 3.3 Ermittlung der antimikrobiellen Aktivität von CRAMP

Alle in Kapitel 3.1 aufgeführten Bakterien wurden auf ihre Sensitivität CRAMP gegenüber getestet. Dafür wurden die Bakterien wie beschrieben (3.1) angezogen und auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,015 und 0,03 im entsprechenden Medium verdünnt. Der antimikrobielle Assay wurde in 100 µl Ansätzen durchgeführt. 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 15, 20, 30, 50 und 100 µg/ml

CRAMP wurden auf ihre antimikrobielle Aktivität den verschiedenen Bakterien gegenüber getestet. Ein Ansatz bestand aus 90 µl der zu testenden CRAMP Konzentration in physiologischem Phosphatpuffer (10 mM, pH 7,2) und 10 µl der Bakteriensuspension. Die Mischung wurde für 60 Minuten bei 37°C inkubiert, dann wurden 20 µl jedes Ansatzes auf Agarplatten ausgestrichen und die Platten bei 37°C inkubiert. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien jedes Ansatzes wurde mit der Anzahl Kolonien des Kontrollansatzes (Bakterien in Puffer) verglichen und per Augenmaß in vier Kategorien eingeteilt: kein Unterschied zur Kontrolle; ca. 50 % der Kontrolle; < 10 % der Kontrolle; keine Kolonien gewachsen.

### **3.4 Stimulation von Zellen in vitro**

In vitro Stimulationsexperimente wurden mit allen unter 3.1 aufgelisteten Zelllinien durchgeführt. Für die Stimulation wurden die Zellen in 6-Loch oder 24-Loch Platten ausgesät. LPS (10 / 100 ng/ml) und CRAMP / LL-37 wurden in den entsprechenden Medien vorverdünnt und unmittelbar hintereinander auf die Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und im ELISA (siehe 3.8) auf Zytokine untersucht. Für die Stimulation von LA-4 mit Bakterien wurden die Bakterien bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und im Ausgangsvolumen PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde bei 95°C für 30 Minuten inkubiert um die Bakterien abzutöten und dann in einer Konzentration von 1:10 auf die Zellen gegeben. Nach 18 Stunden wurden die Zellen mit Lysepuffer (Qiagen; Hilden) abgelöst und das Lysat für eine spätere RNA Isolation (siehe 3.12) bei -80 °C eingefroren.

### **3.5 Infektion und Präparation von Mäusen**

Alle Infektionsversuche wurden mit vier bis acht Tieren pro Gruppe durchgeführt. Es wurden entweder nur WT Tiere verwendet oder WT und KO Mäuse verglichen. Alle Infektionen wurden intranasal durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere durch intraperitoneale (i. p.) Injektion von 2,5 mg Ketaminhydrochlorid (Ketanest, Parke Davis; Berlin) und 0,18 mg Xylazinhydrochlorid (Rompun, Bayer AG; Leverkusen) betäubt und an den Schneidezähnen an einem gespannten Draht aufgehängt. Die Bakterien wurden wie in Kapitel 3.1 beschrieben angezogen und eine Bakteriensuspension mit der gewünschten Infektionsdosis pro 40 µl PBS

hergestellt. Diese wurde in vier 10 µl Schritten den Mäusen zum Einatmen verabreicht. Nach Ablauf der gewünschten Infektionsdauer wurden die Tiere betäubt und mit Genickbruch getötet. Die Luftröhre wurde punktiert und eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durch Spülung der Lunge mit 5 x 1 ml PBS durchgeführt. Die BAL wurde aufgefangen und bis zur Bestimmung der Zellzahl und Herstellung von Zytospins (siehe 3.7) auf Eis gelagert. Als nächstes wurden Lunge und Luftröhre entnommen. Die rechten Lungenlappen wurden für die Ermittlung der Bakterienzahl (siehe 3.6) in 1 ml PBS homogenisiert und auf Eis gestellt. Der linke Lungenflügel wurde in 3,7 % Formalin fixiert und später in Paraffin eingebettet. Die Luftröhre wurde in 600 µl Lysepuffer (Qiagen; Hilden) homogenisiert und bis zur RNA Isolation (siehe 3.12) bei -80°C eingefroren.

### **3.6 Ermittlung der Bakterienzahl in der Lunge**

Von den Lungenhomogenisaten wurden geeignete Verdünnungen hergestellt und auf Agarplatten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C inkubiert bis Kolonien sichtbar waren. Dann wurden die Kolonien ausgezählt und die lebenden Bakterien pro ml Lungenhomogenisat errechnet. Der Rest der Lungenhomogenisate wurde abzentrifugiert und die Überstände wurden für eine spätere Bestimmung der Zytokinkonzentration bei -80 °C gelagert.

### **3.7 Aufbereitung der BAL**

Die Bestimmung der Zellzahl und die Herstellung der Zytospins für die Differentialzellzählung erfolgten kurz nach Durchführung der Lungenspülung. Die Zellen der BAL wurden herunterzentrifugiert (4°C, 10 min, 900 upm) und die Überstände (BALF) für spätere ELISA (siehe 3.8) und Western Blot (siehe 3.9) Analysen bei -80°C gelagert. Die Zellpellets wurden in 1 ml PBS aufgenommen. Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit Kristallviolettlösung (50 mg Kristallviolett, 0,5 ml Eisessig in 10 ml H<sub>2</sub>O) verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Für die Herstellung der Zytopräparate wurden 100000 - 200000 Zellen in einer Zytocentrifuge für 10 Minuten bei 500 upm auf Objektträger zentrifugiert. Diese wurden über Nacht an der Luft getrocknet und dann durch eine panoptische Zellfärbung nach Pappenheim (kombinierte



May-Grünwald-Giemsa-Färbung) angefärbt. Dazu wurden die Präparate fünf Minuten in May-Grünwald-Färbelösung inkubiert, zweimal mit Leitungswasser gespült, 20 Minuten in Giemsa-Gebrauchslösung inkubiert und in Leitungswasser gewaschen. Sie wurden getrocknet und mit Corbit eingedeckelt. Bei jedem Präparat wurde der Zelltyp von 150-200 Zellen morphologisch bestimmt und so der prozentuale Anteil jedes Zelltyps ermittelt.

### **3.8 ELISA („enzyme-linked immuno sorbent assay“)**

Zytokin Konzentrationen in BALF und Lungenhomogenisaten von Mäusen sowie in Kulturüberständen von Zelllinien und von humanen DZ und murinen peritonealen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten wurden mittels kommerziell erhältlicher ELISA Kits nach Anleitung des Herstellers (R&D Systems; Wiesbaden-Nordenstadt) bestimmt. Folgende humane Zytokine wurden mittels ELISA nachgewiesen: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Außerdem wurde die Konzentration der folgenden murinen Zytokine im ELISA gemessen: IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-6, IL-13, KC, TNF- $\alpha$  und MIP-1  $\gamma$ .

### **3.9 Gelelektrophorese und Western Blot**

CRAMP wurde in den BALF der Mäuse mit Hilfe einer Western Blot Analyse nachgewiesen. BALF wurden entweder direkt mit Laemmli Probenpuffer (BioRad; München) versetzt oder erst durch Abdampfen von Flüssigkeit im Vakuum auf ein Fünftel des Volumens ankonzentriert. Die mit Probenpuffer versetzten Proben wurden für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen (10-20 % Tris-HCL Polyacrylamid Gel, BioRad; München). Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran (BioRad; München) übertragen, und die Membran wurde mit Milchpulver (10 % in PBS) geblockt und mit dem CRAMP Antiserum (1:50 in PBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion wurde mit einem Meerrettichperoxidase gekoppelten anti-Kaninchen Antikörper (GE Healthcare, München) und einem Chemolumineszenz Reagenz (Pierce; Bonn) durchgeführt. Ein Röntgenfilm (Kodak; Deutschland) wurde aufgelegt und in einem Filmentwickler (CURIX 60, AGFA; Köln) entwickelt.

### 3.10 Zytokin Array

Die BALF aus dem Infektionsversuch mit *P. aeruginosa* NH 57388A für zwei Stunden wurden mit Hilfe eines Zytokinarrays (RayBiotech; Norcross, USA) auf 48 Zytokine untersucht. Hierfür wurden die BALF aller KO Tiere und aller WT Tiere vereinigt. Auf den Arraymembranen befinden sich kleine Flächen mit immobilisierten Antikörpern gegen je ein Zytokin. Die Membranen wurden in der BALF inkubiert, und gebundene Proteine wurden durch spezifische, biotinkoppelte Antikörper, ein Streptavidin Peroxidase Konjugat und ein Chemolumineszenz Reagenz nach Anleitung des Herstellers detektiert. Chemolumineszenz wurde durch Auflegen und Entwickeln eines Röntgenfilms (Kodak; Deutschland) dokumentiert.

### 3.11 Immunhistochemie

Die in Paraffin eingebetteten Lungenflügel wurden so geschnitten, dass auch einige große Atemwege angeschnitten wurden. Die Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und durch dreimal fünfminütiges Kochen in Zitratpuffer (0,01 M, pH 6,0) demaskiert. Die Präparate wurden mit Ziegenerum geblockt und für eine Stunde in einer feuchten Kammer bei RT mit dem CRAMP Antiserum inkubiert. Es wurde CRAMP Antiserum verwendet, das zuvor über eine Protein A Säule (Amersham Biosciences; Uppsala, Schweden) aufgereinigt und ankonzentriert worden war. Es wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Ebenfalls über eine Protein A Säule aufgereinigtes Präimmunserum desselben Tiers wurde in gleicher Konzentration als Negativkontrolle eingesetzt. Gebundene Antikörper wurden mit Hilfe eines Biotin gekoppelten Sekundärantikörpers, einem Streptavidin Peroxidase Konjugats und einer AEC Substratlösung aus einem kommerziellen Kit nach Anleitung des Herstellers (Zymed; Berlin) sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Zellkerne mit Hämalaun (Waldeck; Münster) gegengefärbt. Digitale Fotos wurden mit einer Evolution LC Kamera (Media Cybernetics; Silver Spring, USA) gemacht und mit Hilfe der Image-Pro Discovery Software (Media Cybernetics; Silver Spring, USA) bearbeitet und gespeichert.

### 3.12 Isolation von RNA und RT-PCR

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus LA-4 Zellen und Luftröhren von Mäusen wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen; Hilden) benutzt. Ein DNA Verdau wurde während der Isolation der RNA auf der Säule mit Hilfe des RNase free DNase Sets (Qiagen; Hilden) durchgeführt. Für die reverse Transkription wurden 1,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt und die cDNA mit einem cDNA Synthese Kit (MBI Fermentas; St. Leon-Rot) mittels oligo(dT)<sub>18</sub> Primern synthetisiert. Die cDNA wurde 1:10 verdünnt und 5 µl hiervon in jeder PCR Reaktion (25 µl Volumen) eingesetzt. Für die PCR Ansätze wurde ein SYBR Green PCR Mix (ABgene; Hamburg) nach Anleitung des Herstellers eingesetzt. Die verwendeten CRAMP (5'-TGTGCCTTCAAGGAACAGGG-3' und 5'-AATTTTCTTGAACCGAAAGGGC-3') und GAPDH (5'-CATGGCCTTCCGTGTTCTAC-3' und 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAG GAG-3') Primer wurden von TIB Molbiol (Berlin) bezogen. Folgendes PCR Protokoll wurde angewendet: 3 Minuten 95°C; 40 Zyklen mit 15 Sekunden 95°C und 45 Sekunden 60°C; eine Minute 95°C; eine Minute 55°C; Schmelzkurve (55°C bis 94°C in 0,5°C Schritten). Die realtime PCR wurde in einem ICycler (BioRad; München) durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden –RT-Proben und Wasser mitgeführt. Die relative Expression normalisiert auf GAPDH wurde mittels der  $\Delta\Delta CT$  Methode berechnet [123,124]. Die PCR Effizienz war für alle Reaktionen vergleichbar.

### 3.13 Isolation neutrophiler Granulozyten und Makrophagen aus der Bauchhöhle von Mäusen

Für die Gewinnung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen wurden ein bis zwei Mäuse pro Gruppe verwendet. Zur Anreicherung von Immunzellen in der Bauchhöhle wurde den Mäusen 1-2 ml Thioglykollat Medium (BD Difco; Heidelberg) i. p. gespritzt. Zur Gewinnung von neutrophilen Granulozyten wurden die Mäuse nach vier Stunden mit Isofluran (Forene; Abbott; Wiesbaden) betäubt und durch Genickbruch getötet; zur Gewinnung von Makrophagen wurden sie nach drei Tagen getötet. Um die Bauchhöhlenspülung durchzuführen, wurden die Mäuse auf dem Rücken liegend fixiert, und das Bauchfell aufgeschnitten und abgezogen ohne die Bauchhöhle zu verletzen. Dann wurden 10 ml eiskaltes PBS in die Bauchhöhle gespritzt und wieder herausgesogen. Dies wurde mit weiteren 10 ml PBS wiederholt. Die Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert und so in Medium

aufgenommen, dass sie die gewünschte Zellkonzentration (1 Mio Zellen / ml) erreichten. Für neutrophile Granulozyten wurde RPMI und für Makrophagen DMEM verwendet.

### **3.14 Stimulation peritonealer Makrophagen und neutrophiler Granulozyten**

Peritoneale Makrophagen aus WT und KO Tieren wurden in DMEM (ohne FCS) in einer 24-Loch Platte ausgesät und für 1h im Brutschrank kultiviert. In dieser Zeit setzten sich die Makrophagen am Boden ab, andere Zellen blieben im Überstand. Nach 1h wurde der Überstand abgesaugt und die adhären Zellen mehrmals mit DMEM gewaschen. Dann wurden die Makrophagen mit 10 ng/ml LPS und verschiedenen Konzentrationen an CRAMP (1,25 - 10 µg/ml) in DMEM + 10 % FCS stimuliert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Konzentration an abgegebenem Zytokinen mittels ELISA bestimmt.

Peritoneale neutrophile Granulozyten aus WT und KO Tieren wurden in RPMI + 1 % FCS in 24- oder 96-Loch Platten ausgesät. Sie wurden mit 100 ng/ml LPS und verschiedenen Konzentrationen an CRAMP (0,3 – 10 µg/ml) für vier Stunden inkubiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Konzentration an abgegebenen Zytokinen mittels ELISA bestimmt.

### **3.15 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies**

Die RSS Produktion von peritonealen neutrophilen Granulozyten aus WT und KO Mäusen wurde verglichen. RSS wurden mit Hilfe des Substrats L-012 (Wako; Neuss) nachgewiesen. L-012 reagiert mit RSS, wobei Lumineszenz freigesetzt wird, die in einem Luminometer detektiert wird. 100000 Zellen in farblosem RPMI wurden pro Loch in eine weiße 96-Loch Platte ausgesät und mit L-012 für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde die RSS Produktion durch die Zugabe von 1 µM PMA (Sigma-Aldrich; München) induziert und die abgegebene Lumineszenz in einem Plattenluminometer über 15 Minuten detektiert.

### 3.16 LPS-Galaktosamin Modell

In diesem, in der Literatur ausführlich beschriebenen Modell [125], werden Mäuse durch i. p. Injektion von Galaktosamin gegenüber LPS sensibilisiert, so dass schon kleine Mengen i.p. applizierten LPS zu einer Sepsis führen. In diesem Modell lassen sich Unterschiede von Mäusen bei der Erkennung und Reaktion auf LPS besonders gut erkennen. Es wurden vier WT und vier KO Mäuse verwendet. Den Mäusen wurde 18 mg Galaktosamin (Sigma-Aldrich; München) und 100 ng LPS zusammen in 300 µl PBS i.p. gespritzt. Dann wurde das Überleben der Mäuse über 24 Stunden beobachtet.

### 3.17 Hervorrufen einer Sepsis durch *E. coli* Infektion der Lunge

In diesem Modell wird eine Sepsis durch eine *E. coli* Infektion der Lunge hervorgerufen. Es wurden sechs WT und sechs KO Mäuse verwendet. *E. coli* J96 wurde wie beschrieben (3.1) angezogen und überimpft. 200 µl der Bakteriensuspension bei  $OD_{600} = 1,0$  wurden abzentrifugiert und in 1400 µl PBS resuspendiert. Die Mäuse wurden mit  $4 \times 10^6$  µl dieser Bakteriensuspension (entspricht einer Infektionsdosis von  $8 \times 10^6$  Bakterien pro Maus) wie unter 7 beschrieben infiziert, und ihr Überleben über 5 Tage beobachtet.

### 3.18 Isolation humaner Monozyten und Generierung von DZ

Für die Experimente mit DZ wurden DZ in vitro aus Monozyten generiert. Dazu wurden zunächst mononukleäre Zellen aus einem Buffy Coat (Blutbank der Philipps-Universität Marburg) durch Dichtegradientenzentrifugation über einen Ficoll Gradienten (Dichte 1,077 g/ml; Biochrom AG; Berlin) isoliert. Die weitere Aufreinigung der Monozyten erfolgte mit MACS Technologie nach Anleitung des Herstellers (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach). Mit Hilfe von magnetischen Kügelchen, an die ein anti-CD14 Antikörper gebunden ist, wurden die CD14 positiven der mononukleären Zellen isoliert. Dies sind die Monozyten. Die Zellzahl wurde bestimmt und die Zellen wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml in großen Zellkulturschalen ausgesät. Damit sich die Monozyten zu DZ differenzieren, wurde als Medium RPMI + 10 % FCS verwendet, das 20 ng/ml IL-4 und 50 ng/ml GM-CSF enthielt (DZ-Medium). DZ wurden grundsätzlich in diesem Medium kultiviert und stimuliert.

Die Zellen wurden für sieben Tage kultiviert, wobei am vierten Tag die Hälfte des Mediums gegen frisches DZ-Medium ausgetauscht wurde. Nach sieben Tagen haben sich die Monozyten zu unreifen DZ differenziert und können für Experimente verwendet werden.

### **3.19 Stimulation von DZ und Analyse der Zytokinabgabe**

Sieben Tage alte unreife DZ wurden in 24-Loch Platten ausgesät (200000 pro Loch) und stimuliert. Zur Aktivierung der unreifen DZ wurden folgende Stimuli verwendet: 10 ng/ml LPS, 10 µg/ml LTA (Sigma-Aldrich; München), 100 ng/ml Flagellin (InvivoGen; Toulouse, Frankreich), 25 µg/ml Poly I:C (InvivoGen; Toulouse, Frankreich) und ein Zytokingemisch bestehend aus 10 ng/ml IL-1β, 150 ng/ml IL-6 und 10 ng/ml TNF-α (alle R&D Systems; Wiesbaden-Nordenstadt). Alle diese Stimuli wurden alleine und zusammen mit 20 µg/ml LL-37 eingesetzt. LPS wurde zusätzlich auch zusammen mit 2 und 5 µg/ml LL-37 sowie mit 5 und 20 µg/ml sLL-37 auf die Zellen gegeben. Außerdem wurden die Zellen auch mit 2, 5 und 20 µg/ml LL-37 alleine inkubiert. In einem Experiment wurde der Einfluss von verschiedenen Inhibitoren getestet. Dazu wurden unreife DZ mit den folgenden Konzentrationen an Inhibitoren für 60 Minuten vorinkubiert: 50 ng/ml Pertussis Toxin (Inhibitor G-Protein gekoppelter Rezeptoren; Calbiochem; Darmstadt), 50 µM PD98059 (MEK Inhibitor; Alexis; Nottingham, UK), 25 µM LY294002 (PI3-Kinase Inhibitor; Biomol; Hamburg) und 5 µM GF109203X (PKC Inhibitor; Calbiochem; Darmstadt). Dann wurde 10 ng/ml LPS und / oder 20 µg/ml LL-37 dazugegeben. Bei allen Experimenten wurde der Überstand nach 48 Stunden abgenommen und mittels ELISA auf IL-6 und TNF-α untersucht. In einigen Experimenten wurden auch die Konzentrationen von IL-10 und IL-12p70 bestimmt. Wenn das Zytokingemisch als Stimulus verwendet wurde, wurde nur die Konzentration von IL-12p70 bestimmt.

### **3.20 FACS („fluorescence-activated cell sorting“) Analyse**

Für die FACS Analyse von Oberflächenmarkern wurden  $1 \times 10^6$  unreife DZ in 6-Loch Platten ausgesät. Die folgenden Stimuli wurden mit und ohne Zugabe von 5 / 20 µg/ml LL-37 verwendet: 10 ng/ml LPS, 10 µg/ml LTA (Sigma-Aldrich; München), 100 ng/ml Flagellin (InvivoGen; Toulouse, Frankreich) und ein Zytokingemisch bestehend aus 10 ng/ml IL-1β,

150 ng/ml IL-6 und 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (alle R&D Systems; Wiesbaden-Nordenstadt). Als Kontrolle wurden nicht stimulierte unreife DZ sowie Zellen, die mit 10 ng/ml LPS und 20  $\mu$ g/ml sLL-37 inkubiert wurden, verwendet. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Überstände abgenommen, die Zellen abzentrifugiert und die adhärenen Zellen durch Inkubation mit eiskaltem PBS und leichtem Schaben abgelöst. Die Zellen wurden vereinigt, mit FACS Puffer (PBS, 1 % FCS, 0,1 % NaN<sub>3</sub>) gewaschen und abzentrifugiert. Die Proben wurden mit 10  $\mu$ l aufgereinigten Maus IgG (20  $\mu$ g/ml; Dako, Hamburg) für 10 Minuten inkubiert bevor je 1  $\mu$ l der folgenden Antikörper oder entsprechenden Isotypkontrollen dazugegeben wurde: Fluorescein Isothiocyanat (FITC) gekoppelter anti-CD14, Phycoerythrin (PE) gekoppelter anti-CD83 und Allophycocyanin (APC) gekoppelter anti-HLA-DR Antikörper (alle BD Pharmingen, Heidelberg). Außerdem wurde von jeder Probe eine Kontrolle ganz ohne Antikörper mitgeführt. Die Proben wurden für 20 Minuten bei RT mit den Antikörpern inkubiert. Dann wurden sie mit FACS Puffer gewaschen, in FACS Puffer oder Cell Fix (BD Pharmingen; Heidelberg) aufgenommen und in einem FACSort Durchflusszytometer (Becton Dickinson; Heidelberg) der FACS Analyse unterzogen. Die Auswertung wurde mit Hilfe der frei verfügbaren WinMDI 2.8 Software (Joseph Trotter; <http://facs.scripps.edu/software.html>) gemacht.

### **3.21 Aktivierung allogener CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch DZ**

2 x 10<sup>6</sup> unreife DZ wurden in 6-Loch Platten ausgesät. Sie wurden für 48 Stunden mit 10 ng/ml LPS und / oder 20  $\mu$ g/ml LL-37 inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und adhärenen Zellen durch Inkubation mit eiskaltem PBS und leichtem Schaben gelöst. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und in RPMI aufgenommen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden durch MACS Separation mit anti-CD4 Magnetkügelchen (Miltenyi Biotec; Bergisch Gladbach) aus Blut eines gesunden Spenders aufgereinigt. Zur Aktivierung durch DZ wurden 150000 CD4<sup>+</sup> T-Zellen zusammen mit 50000 der verschieden stimulierten DZ in einer 96-Loch Platte bei 37°C kultiviert. Nach 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf abgegebenes IL-2 und IFN- $\gamma$  untersucht.

### 3.22 Untersuchung DZ auf Apoptose und Nekrose

Um zu testen, ob sich die Inkubation mit LL-37 schädlich auf DZ auswirkt, wurde zunächst die Anzahl an lebenden DZ nach 24 Stunden Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an LL-37 durch Umsetzung des Substrats WST-1 (Roche Applied Science; Mannheim) gemessen und mit der Anzahl lebender Zellen in der unstimulierten Kontrolle verglichen. WST-1 wird von lebenden Zellen reduziert, wodurch ein Produkt mit veränderter Absorption entsteht. Diese ist proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Probe. 50000 unreife DZ wurden in einer 96-Loch Platte ausgesät und mit 2, 5, 20 und 50 µg/ml LL-37 inkubiert. Nach 24 Stunden wurde WST-1 dazugegeben und die Zellen für weitere zwei Stunden inkubiert. Dann wurde die Absorption bei 450 nm in einem Plattenphotometer bestimmt.

Um zu untersuchen, ob LL-37 Apoptose oder Nekrose induziert, wurden 200000 unreife DZ in 24-Loch Platten ausgesät und mit 2, 5 und 20 µg/ml LL-37 oder 5 µM Paclitaxel (Sigma-Aldrich; München) als Positivkontrolle für Apoptose inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Bindepuffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4) gewaschen und erst mit biotinkoppeltem Annexin V (Molecular Probes; Karlsruhe) für 15 Minuten bei RT und dann mit Alexa Fluor 488 gekoppeltem Streptavidin (Molecular Probes; Karlsruhe) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in Bindepuffer gewaschen und aufgenommen und 1 µg/ml Propidium Iodid (Molecular Probes; Karlsruhe) wurde hinzugegeben. Direkt anschließend wurde die Bindung von Annexin V an apoptotische Zellen und die Färbung toter Zellen mit Propidium Iodid in einem Durchflusszytometer (FACSort, Becton Dickinson; Heidelberg) detektiert. Die Auswertung wurde mit Hilfe der frei verfügbaren WinMDI 2.8 Software (Joseph Trotter; <http://facs.scripps.edu/software.html>) gemacht.

### 3.23 Statistische Analyse

Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Vergleiche zwischen Gruppen wurden mittels T Tests (zweiseitig) oder mittels ANOVA bei Experimenten mit mehr als zwei Untergruppen analysiert. Post hoc Tests wurden mittels T Test (zweiseitig) mit Bon-ferroni Anpassung durchgeführt. Ergebnisse für  $P < 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 CRAMP Expression bei Infektion der Atemwege

Zahlreiche Patientenstudien zeigen, dass LL-37/hCAP18, das humane Cathelizidin, bei bakteriellen Infektionen des Respirationstrakts gebildet und in die Atemwegsflüssigkeit abgegeben wird [109,120]. LL-37/hCAP18 wird in der Lunge von verschiedenen Zelltypen gebildet, wie z.B. Epithelzellen, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Über die Funktion von LL-37/hCAP18 bei Infektionen der Lunge ist jedoch bisher nichts bekannt. Auch über die Expression und Funktion von CRAMP, dem murinen Cathelizidin und Strukturhomolog von LL-37, bei einer Infektion der Atemwege ist bisher noch nichts bekannt. In dieser Arbeit sollte daher zunächst die Expression von CRAMP bei Mäusen während einer Infektion der Lunge untersucht werden.

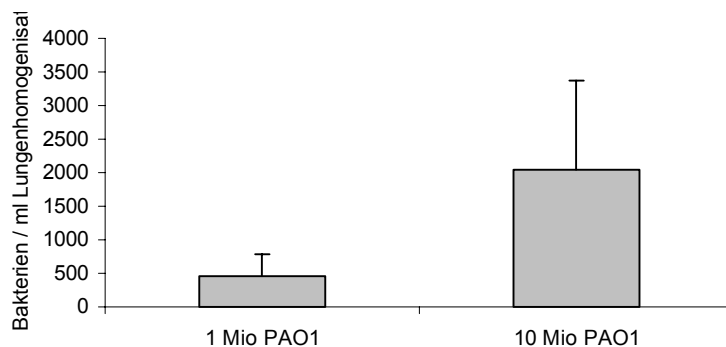
#### 4.1.1 Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1

Um die Expression von CRAMP während einer akuten bakteriellen Infektion der Lunge zu untersuchen, wurden Mäuse mit dem *P. aeruginosa* Stamm PAO 1 infiziert. Zur Infektion wurden die Mäuse betäubt, an den Schneidezähnen aufgehängt und die Bakteriensuspension intranasal verabreicht.

##### 4.1.1.1 Die bakterielle Infektion der Lunge wird zügig geklärt

Zunächst wurde eine geeignete Bakterienzahl zur Infektion ermittelt. Ziel war eine starke Infektion der Lunge, die nicht letal für die Mäuse war. Es wurden  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  *P. aeruginosa* PAO1 getestet. Die Infektion mit beiden Dosen führte zu sichtbaren Krankheitszeichen. Die Mäuse bekamen ein struppiges Fell, waren wenig aktiv und schläfrig. 24 Stunden nach der Infektion wirkten die Mäuse, die  $1 \times 10^7$  PAO1 erhalten hatten, immer noch sehr träge und krank. Die Mäuse, die nur mit  $1 \times 10^6$  PAO1 infiziert worden waren, wirkten dagegen wieder normal aktiv. Die Mäuse wurden durch Genickbruch getötet, die Lungen entnommen und die rechten Lungenlappen in PBS homogenisiert. Mäuse, die für 24

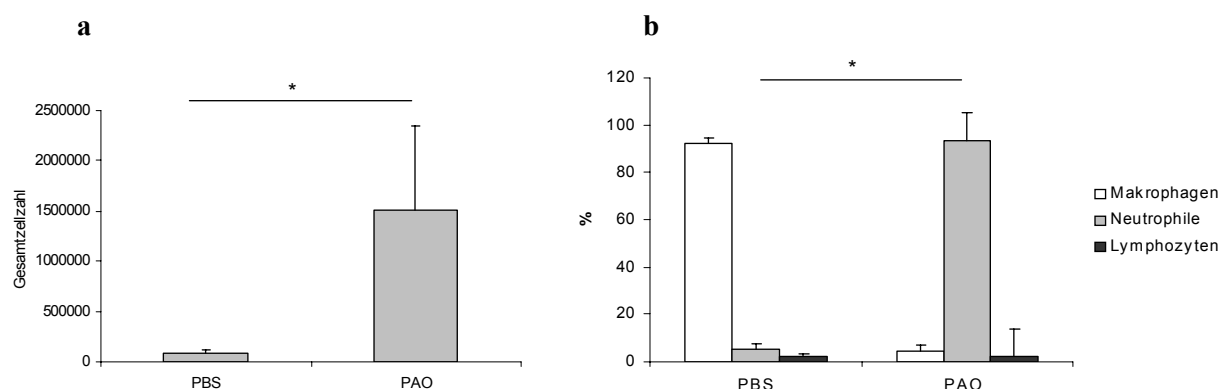
Stunden mit  $1 \times 10^6$  PAO1 infiziert worden waren, hatten im Schnitt noch 450 Bakterien in der Lunge. Mäuse, die mit  $1 \times 10^7$  PAO1 infiziert worden waren, hatten noch durchschnittlich 2040 Bakterien in der Lunge (Abb. 4). Dies bedeutet, dass die Mäuse innerhalb von 24 Stunden schon über 99,9 % der Bakterien abgetötet hatten. Da die Mäuse auch die Infektion mit der höheren Dosis gut klären konnten, wurden für die weiteren Versuche mit *P. aeruginosa* PAO1 immer  $1 \times 10^7$  Bakterien verwendet.



**Abb. 4: Anzahl Bakterien in der Lunge 24 h nach der Infektion.** Mäuse wurden mit  $1 \times 10^6$  (1 Mio PAO1) oder  $1 \times 10^7$  (10 Mio PAO1) *P. aeruginosa* PAO1 für 24 h infiziert. Die rechten Lungenlappen wurden in 1 ml PBS homogenisiert, und durch Ausstreichen geeigneter Verdünnungen wurde die verbliebene Bakterienzahl in der Lunge ermittelt. (n=4)

#### 4.1.1.2 Die akute bakterielle Infektion der Lunge führt zu einer neutrophilen Entzündung

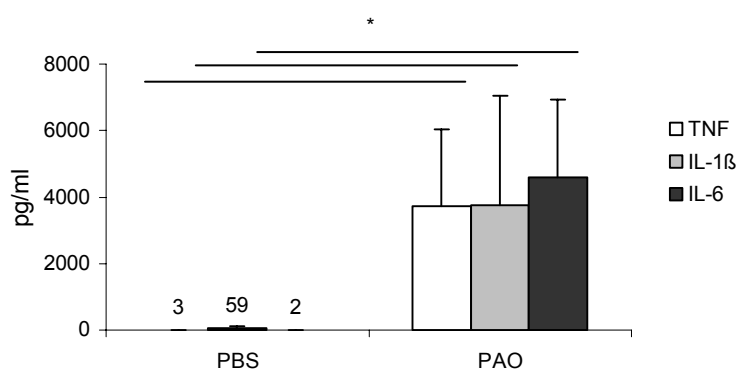
Als nächstes wurde die Entzündung in Folge der Infektion mit PAO1 hinsichtlich verschiedener Entzündungsmarker näher charakterisiert. Hierfür wurden Mäuse mit  $1 \times 10^7$  PAO1 infiziert. Zur Kontrolle wurden Mäuse mitgeführt, die anstelle der Bakterien PBS erhielten. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse lavagiert, und die BAL auf Gesamtzellzahl und Zellzusammensetzung sowie auf den Gehalt an proinflammatorischen Zytokinen untersucht.



**Abb. 5: Infektion mit PAO1 führt zu einem starken Einstrom von neutrophilen Granulozyten.** 24 h nach der Infektion mit PAO1 wurden die Mäuse lavagiert. a) Gesamtzellzahl in der BAL b) Differentialzellzählung; prozentualer Anteil an Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten in der BAL. Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 5$ ).

Die stark erhöhte Gesamtzellzahl in der BAL infizierter Tiere (Abb. 5a) zeigt, dass die Infektion des Respirationstrakts mit *P. aeruginosa* PAO1 zu einem Einstrom von Immunzellen in die Lunge geführt hat. Die Differentialzellzählung zeigt, dass dies auf einen starken, für akute Infektionen charakteristischen Einstrom von neutrophilen Granulozyten zurückzuführen ist (Abb. 5b).

Die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  in den BALF wurden mittels ELISA bestimmt. Die PBS Kontrolltiere hatten kaum detektierbare Mengen an diesen Zytokinen in der BALF, wogegen die infizierten Tiere sehr hohe Level an allen gemessenen Zytokinen aufwiesen (Abb. 6).

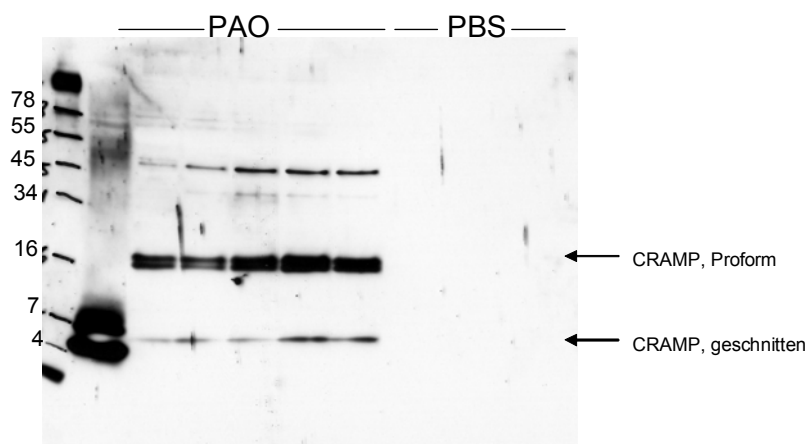


**Abb. 6: Infektion mit PAO 1 führt zu hohen Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen in der BALF.** 24 h nach der Infektion mit PAO 1 wurden die Mäuse lavagiert. Die Konzentrationen an IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  in den BALF wurden im ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 5$ ).

#### 4.1.1.3 Die bakterielle Infektion führt zu einer gesteigerten Expression von CRAMP

##### *CRAMP wird ins Atemwegssekret abgegeben*

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Infektion des Respirationstrakts mit *P. aeruginosa* PAO1 zu einer vermehrten Bildung und Ausschüttung von CRAMP führt. Hierzu wurden die BALF von infizierten und nicht infizierten Mäusen mit Hilfe einer Western Blot Analyse auf die Anwesenheit von CRAMP untersucht.



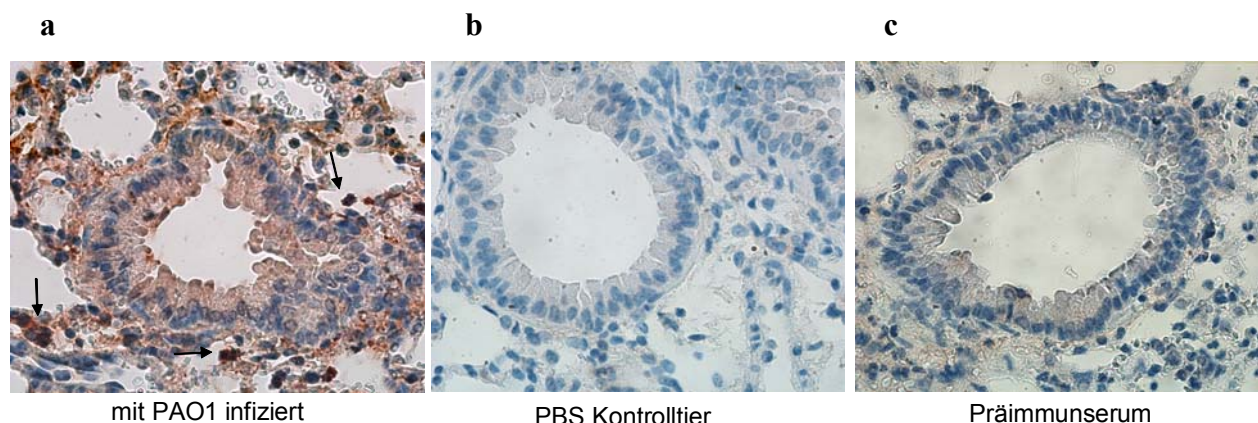
**Abb. 7: CRAMP befindet sich in der BALF von infizierten Tieren.** 24 h nach der Infektion mit PAO1 wurden die Mäuse lavagiert. Die BALF von fünf infizierten und vier nicht infizierten Tieren wurden im Western Blot auf CRAMP untersucht. Als Positivkontrolle wurde 10 ng synthetisches CRAMP eingesetzt.

In den BALF der mit PAO1 infizierten Tiere sind deutlich die Banden des prozessierten, aktiven Peptids (~ 4 kDa) sowie Doppelbanden der ungeschnittenen Proform (~18 kDa) zu sehen (Abb. 7). Bei den PBS Kontrolltieren ist CRAMP in keiner Form zu detektieren. Als Positivkontrolle wurde 10 ng synthetisch hergestelltes CRAMP aufgetragen. Dieses bildet zwei Banden, was auf die Bildung von Dimeren zurückzuführen sein könnte.

##### *CRAMP wird in Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten exprimiert*

Als nächstes sollte untersucht werden, von welchen Zelltypen CRAMP gebildet wird. Um dies zu überprüfen, wurden die Lungen von Mäusen, die für 24 Stunden mit PAO1 infiziert worden waren, entnommen und fixiert. Von den linken Lungenflügeln wurden

Paraffinschnitte hergestellt und immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen CRAMP gefärbt. Als Kontrolle wurden Lungen von Mäusen verwendet, die nur PBS erhalten hatten.

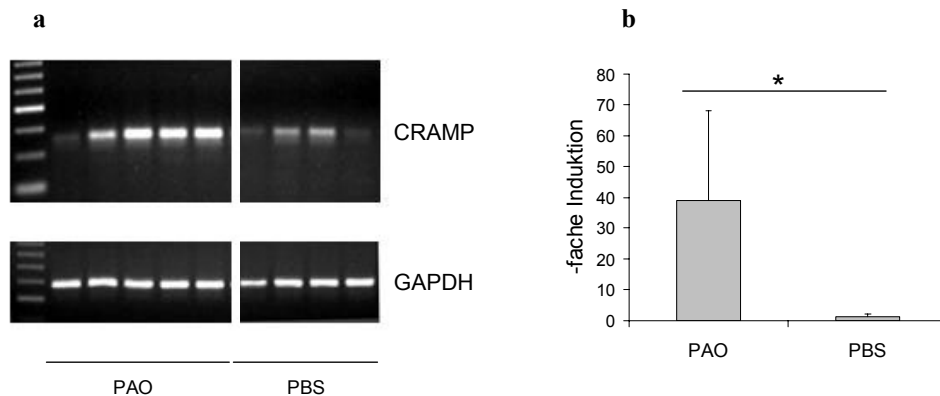


**Abb. 8: CRAMP wird in den Lungen infizierter Mäuse stark exprimiert.** Paraffinschnitte von Lungen aus infizierten und nicht infizierten Tieren wurden mit einem CRAMP Antiserum immunhistochemisch angefärbt. a) Lunge eines mit PAO1 für 24 h infizierten Tiers b) Lunge eines nicht infizierten PBS Kontrolltiers c) gleiche Lunge wie in a) aber mit dem Präimmunserum anstelle des Antiserums inkubiert.

In den Lungen der PBS Kontrolltiere sind keine gefärbten Zellen zu erkennen (Abb. 8b). Im Gegensatz dazu sind in Lungenschnitten der mit PAO1 infizierten Tiere deutlich die eingewanderten neutrophilen Granulozyten zu erkennen (Abb. 8a; einige neutrophile Granulozyten sind mit Pfeilen markiert). Diese sind dunkelrot gefärbt. In der Mitte der Bilder ist jeweils der Anschnitt eines größeren Atemwegs zu sehen. Auch die Zellen des Atemwegsepithels sind in den Lungenschnitten von infizierten Mäusen rot gefärbt, wogegen sie in den Lungen von PBS Kontrolltieren ungefärbt sind (Abb. 8a, b). Zur Kontrolle wurde ein Lungenschnitt des für Abbildung 8a verwendeten Tiers statt mit CRAMP Antiserum mit aus demselben Tier gewonnenem Präimmunserum inkubiert, was jedoch zu keiner Farbreaktion führte (Abb. 8c). Die Bilder zeigen, dass die Expression von CRAMP in Atemwegsepithelzellen bei einer PAO1 Infektion induziert wird.

Um dies auch auf mRNA Ebene zu zeigen, wurde aus den Luftröhren von infizierten und nicht infizierten Mäusen RNA isoliert und mittels RT-PCR die Menge der CRAMP mRNA verglichen. Abb. 9a zeigt, dass eine RT-PCR mit RNA aus infizierten Tieren eine größere Menge CRAMP PCR Produkt geliefert hat als mit RNA aus PBS Kontrolltieren. Mittels realtime RT-PCR und Normierung auf GAPDH wurde errechnet, dass die CRAMP

Expression in den Luftröhren der mit PAO1 infizierten Tiere ungefähr 40fach gegenüber den PBS Kontrolltieren induziert war (Abb. 9b).



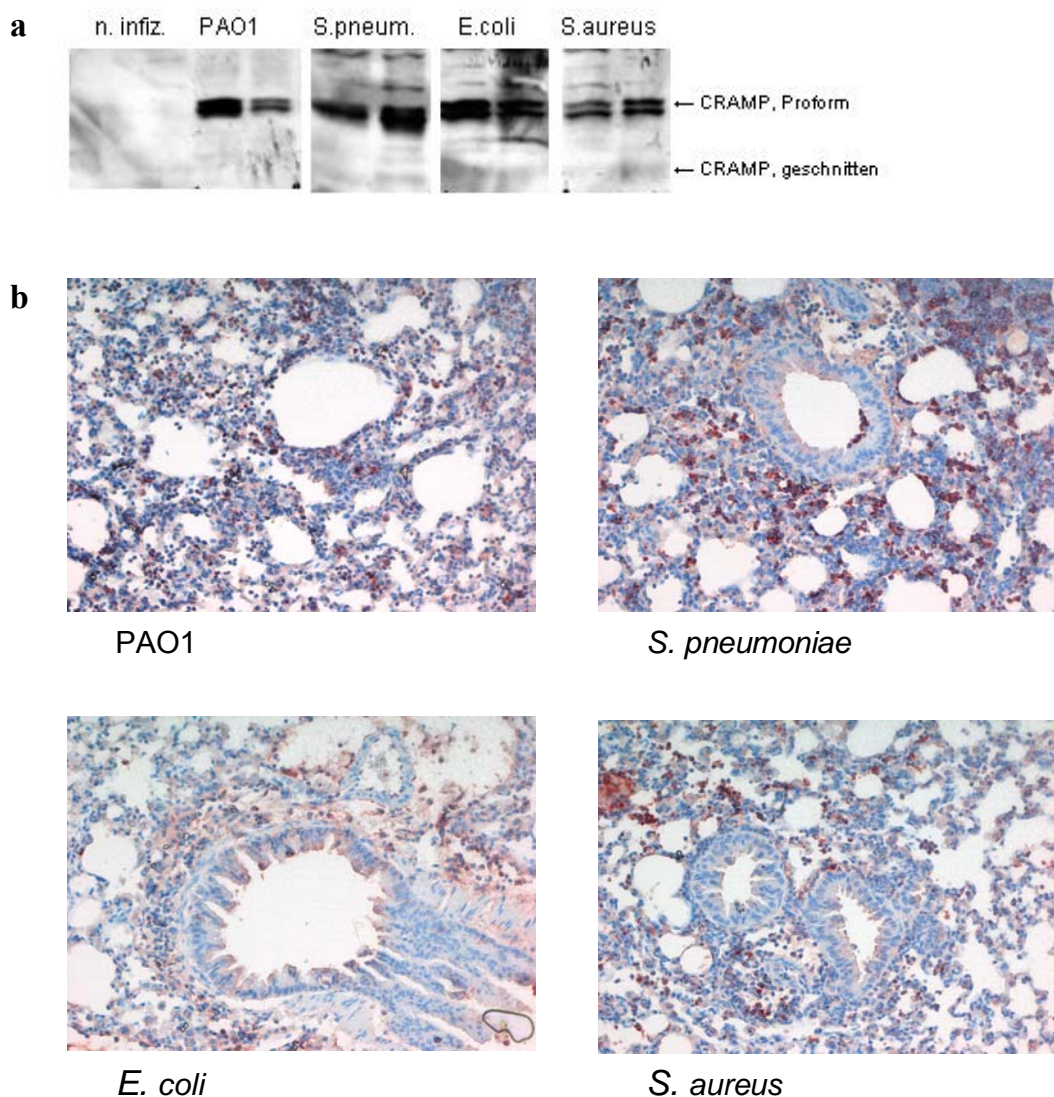
**Abb. 9: Die CRAMP Expression in Luftröhren von infizierten Tieren ist erhöht.** 24 h nach der Infektion mit PAO1 wurde die RNA aus den Luftröhren der Mäuse isoliert und mittels RT-PCR auf den Gehalt an CRAMP RNA untersucht. a) eine RT-PCR wurde nach 30 Zyklen abgebrochen und auf ein Agarosegel aufgetragen. b) realtime RT-PCR, Normierung auf GAPDH und Errechnung der CRAMP Induktion in infizierten Tieren (PAO) gegenüber nicht infizierten Tieren (PBS) mit der  $\Delta\Delta CT$  Methode. Signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 5$ ).

#### 4.1.2 CRAMP wird auch bei Infektion mit anderen Bakterien exprimiert

In Kapitel 4.1.1.3 konnte gezeigt werden, dass die Infektion mit *P. aeruginosa* PAO1 zu einer Induktion der CRAMP Expression in der Lunge führt. Um zu testen, ob die CRAMP Induktion ein generelles Phänomen bei einer bakteriellen Infektion der Lunge ist, wurden weitere Bakterien für Infektionsversuche verwendet und die CRAMP Expression untersucht. Mit folgenden Bakterien wurden Infektionsversuche durchgeführt: *Streptococcus pneumoniae* PN36 ( $5 \times 10^6$ ), *Escherichia coli* J96 ( $1 \times 10^6$ ) und *Staphylococcus aureus* 113 ( $1 \times 10^7$ ). Alle Bakterien führten zu einer starken Lungeninfektion, die nach 24 Stunden durch einen hohen Einstrom an neutrophilen Granulozyten und hohe Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen in der BAL gekennzeichnet war (Daten nicht gezeigt). Um die Expression von CRAMP zu untersuchen, wurden die BALF von je zwei Tieren aus jedem Infektionsversuch im Western Blot auf Anwesenheit von CRAMP untersucht. Als Kontrolle wurden auch BALF von zwei nicht infizierten und zwei mit PAO1 infizierten Mäusen mitgeführt. Außerdem



wurden Paraffinschnitte der Lungen angefertigt und mit CRAMP Antiserum immunhistochemisch gefärbt.

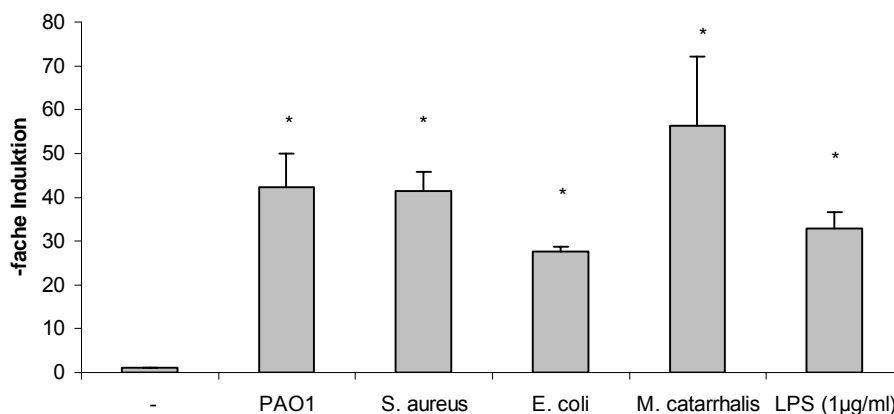


**Abb. 10: Verschiedene Bakterien führen zur Produktion von CRAMP in der Lunge.** Mäuse wurden mit *P. aeruginosa* PAO 1, *S. pneumoniae*, *E. coli* oder *S. aureus* für 24 h infiziert. Die Mäuse wurden lavagiert und ihre Lungen fixiert und in Paraffin eingebettet. a) Western Blot Analyse der BALF b) Immunhistochemische Analyse von Lungenschnitten mit CRAMP Antiserum. (n. infiz. = nicht infiziert)

Abbildung 10 zeigt, dass die Infektion mit allen verwendeten Bakterien zu einer vermehrten Expression und Sekretion von CRAMP führt. Auf dem Western Blot in Abbildung 10a sind in den BALF aller infizierten Tiere zwei nah beieinander liegende, starke Banden zu sehen, die auf der Höhe der CRAMP Proform liegen. In den Proben der beiden nicht infizierten Tiere ist dagegen nichts zu sehen. Die geschnittene Form von CRAMP ist nur in einigen BALF Proben und nur sehr schwach zu erkennen.

#### 4.1.3 Die Expression von CRAMP wird in Atemwegsepithelzellen in vitro induziert

Das humane Cathelizidin, LL-37/hCAP18, gilt in vitro in Atemwegsepithelzellen als nicht induzierbar. Da in den vorangegangenen Tierversuchen gezeigt werden konnte, dass CRAMP in vivo durch verschiedene Bakterien im Lungenepithel induziert wird, sollte abschließend noch überprüft werden, ob CRAMP auch in vitro in einer murinen Lungenepithelzelllinie durch Bakterien induziert werden kann. Für die Stimulation der Zelllinie LA-4 wurden Bakterien verwendet, die schon in den Mausversuchen eingesetzt worden waren, und *Moraxella catarrhalis*, ein weiteres Bakterium, das Lungeninfektionen hervorrufen kann. Zusätzlich wurde LPS als stark immunogener Bestandteil von gramnegativen Bakterien verwendet.



**Abb. 11: CRAMP wird in vitro durch Bakterien induziert.** LA-4 Zellen wurden für 18 h mit verschiedenen, hitzeinaktivierten Bakterien oder LPS (1 µg/ml) stimuliert und die Induktion von CRAMP gegenüber unstimulierten Kontrollzellen (-) mittels realtime RT-PCR, Normierung auf GAPDH und der  $\Delta\Delta\text{CT}$  Methode ermittelt. Signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 3$ ).

Die realtime RT-PCR Daten zeigen, dass alle verwendeten Bakterien sowie LPS die Expression von CRAMP in der Lungenepithelzelllinie LA-4 induzieren können (Abb. 11). Vergleicht man die auf GAPDH genormte Anzahl der CRAMP Transkripte, ergibt sich eine 25-40 fache Induktion der CRAMP Transkription in den stimulierten Zellen gegenüber den nicht stimulierten Zellen.



## 4.2 Die antimikrobielle Aktivität von CRAMP in vitro

Die antimikrobielle Aktivität der Cathelizidine in vitro ist eine der zuerst entdeckten Funktionen dieser Familie AMP.

Auch in dieser Arbeit wurden zunächst einige Bakterien auf ihre Sensitivität CRAMP gegenüber getestet.

Bakterium	~ 50 % Hemmung [µg/ml]	> 90 % Hemmung [µg/ml]	100% Hemmung [µg/ml]
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	3	5	7,5
<i>P. aeruginosa</i> NH57388A	2	4	5
<i>P. aeruginosa</i> NH57388C	2	4	5
<i>E. coli</i> CP9	2	4	15
<i>E. coli</i> J96	4	7,5	10
<i>S. pneumoniae</i> PN36	10	30	100
<i>S. aureus</i> 113 wt	10	50	-
<i>S. aureus</i> 113 $\Delta$ mprF	4	7,5	25
<i>S. aureus</i> 113 $\Delta$ dltA	2	7,5	25

**Tabelle 3: Antimikrobielle Aktivität von CRAMP.** Verschiedene Bakterien wurden mit ansteigenden Konzentrationen CRAMP bei 37°C für 60 min inkubiert und anschließend auf Agarplatten ausgestrichen. Die Anzahl der gewachsenen Kolonien wurde mit einem Puffer-Kontrollansatz verglichen und so das Ausmaß der Hemmung durch CRAMP bestimmt.

CRAMP wirkt auf verschiedene Bakterien unterschiedlich stark antimikrobiell (Tab. 3). So ist von den getesteten Bakterien *P. aeruginosa* am empfindlichsten gegenüber der antimikrobiellen Aktivität von CRAMP. Dabei ist der mukoide Stamm NH57388A noch ein wenig empfindlicher als der PAO1 Stamm. Getestet wurde auch eine Mutante von NH57388A, die kein Alginate produzieren kann [126]. Diese Mutante (NH57388C) war genauso empfindlich gegenüber CRAMP wie der Wildtyp. Relativ empfindlich zeigten sich auch die beiden getesteten Stämme des ebenfalls gramnegativen Bakteriums *E. coli*. Wenig anfällig gegenüber der antibakteriellen Aktivität von CRAMP waren dagegen die beiden grampositiven Bakterien *S. pneumoniae* und *S. aureus*. Von *S. aureus* 113 wurden auch die beiden Mutanten  $\Delta$ mprF und  $\Delta$ dltA getestet, die eine veränderte Zellwand besitzen und für ihre erhöhte Sensitivität antimikrobieller Substanzen gegenüber bekannt sind [62,63]. Auch gegenüber CRAMP zeigten sich beide Mutanten deutlich sensitiver als der Wildtyp, aber weniger sensitiv als *E. coli* und *P. aeruginosa*.

### 4.3 Funktion von CRAMP in vivo bei bakterieller Infektion der Lunge

#### 4.3.1 Die antimikrobielle Aktivität von CRAMP in vivo bei Infektion des Respirationstrakts ist nicht nachweisbar

Nachdem gezeigt werden konnte, dass CRAMP in vitro antimikrobiell auf eine Vielzahl von Bakterien wirkt, und dass die Expression und Abgabe von CRAMP in der Lunge durch eine bakterielle Infektion stark erhöht werden, sollte die Bedeutung von CRAMP als bakterizide Substanz in vivo gezeigt werden. Dazu wurden Infektionsversuche mit CRAMP KO Mäusen durchgeführt. Bei diesen Mäusen ist das Gen für CRAMP durch Insertion einer Neomycin-Resistenz zerstört. Die Mäuse sind gesund und haben im gesunden Zustand keinen bekannten Phänotyp. Bei einer Hautinfektion mit Gruppe A Streptokokken wurde jedoch eine verstärkte und länger anhaltende Infektion und Entzündung als bei WT Mäusen beobachtet [44]. Einige der in Kapitel 4.2. beschriebenen Bakterien wurden verwendet, um Lungeninfektionen bei CRAMP KO und WT Mäusen hervorzurufen und der Verlauf der Infektionen wurde verglichen.

WT und KO Mäuse wurden mit  $1 \times 10^6$  *P. aeruginosa* PAO1 oder  $5 \times 10^6$  *S. pneumoniae* PN36 infiziert. Diese Dosis überlebten alle Mäuse. Äußerlich konnte kein Unterschied zwischen WT und KO Mäusen ausgemacht werden. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet und die Anzahl der lebenden Bakterien in ihren Lungen bestimmt. Sowohl bei Infektion mit PAO1 als auch mit *S. pneumoniae* war kein Unterschied in der Zahl der lebenden Bakterien in den Lungen von WT und KO Mäusen zu sehen (Daten nicht gezeigt). Auch die Anzahl der eingewanderten Immunzellen in die Lungen sowie die Konzentration an abgegebenen proinflammatorischen Zytokinen war in beiden Gruppen gleich (Daten nicht gezeigt).

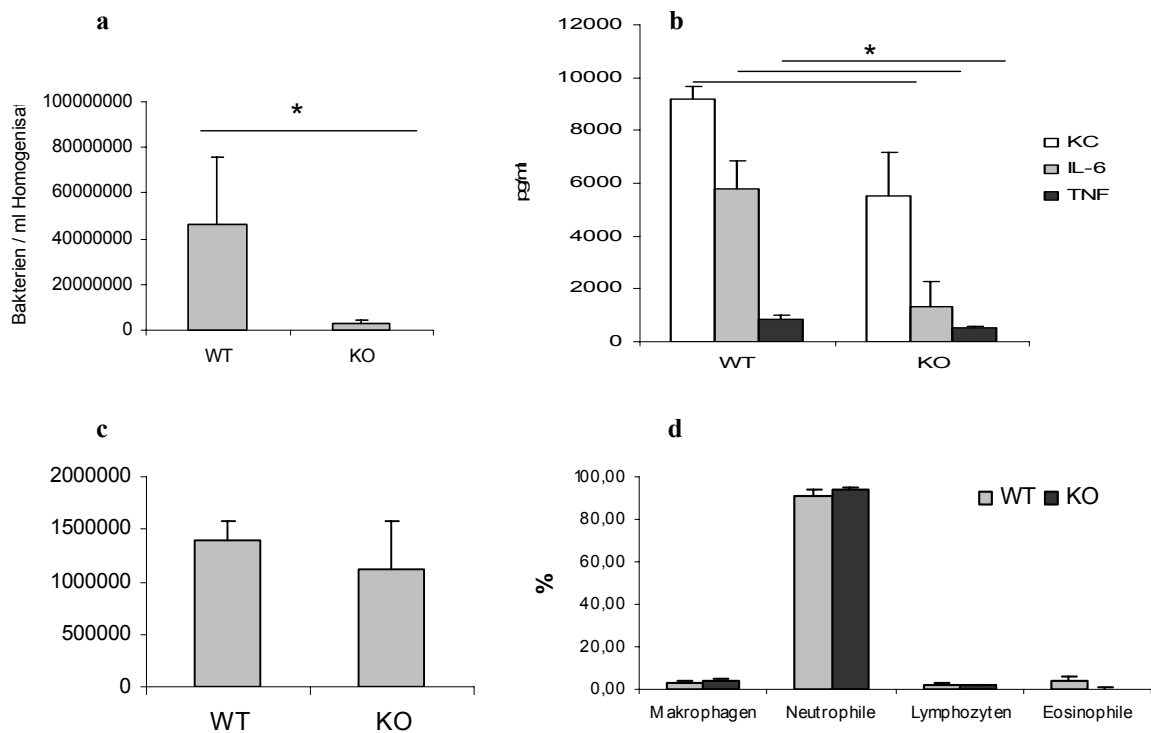
Als nächstes wurden WT und KO Mäuse mit *S. aureus* 113 infiziert, und zwar sowohl mit dem Wildtyp Stamm als auch der gegenüber CRAMP sensitiveren Mutante 113  $\Delta mprF$ . Allerdings konnte auch hier kein Unterschied in der Bakterienzahl in den Lungen zwischen KO und WT Mäusen entdeckt werden, weder bei Infektion mit dem Wildtyp Stamm noch mit der Mutante (Daten nicht gezeigt). Auch die ermittelten Entzündungsparameter unterschieden sich nicht (Daten nicht gezeigt). In keinem der durchgeführten Infektionsexperimente mit CRAMP KO und WT Mäusen konnte ein Hinweis darauf gefunden werden, dass CRAMP in den gewählten Modellen eine direkte antimikrobielle Funktion hat.

#### 4.3.2 CRAMP KO Mäuse klären eine Infektion mit mukoiden *P. aeruginosa* schneller aus ihren Lungen als WT Mäuse

Obwohl die Mäuse eine stark erhöhte Expression und Abgabe von CRAMP bei einer bakteriellen Infektion der Lunge zeigten, konnte in den bisher angewandten akuten Infektionsmodellen kein Phänotyp der CRAMP KO Mäuse bei Klärung der Infektion gefunden werden. Das Fehlen von CRAMP schien die Mäuse in ihrer Fähigkeit, die Bakterien in der Lunge abzutöten, nicht beeinträchtigt zu haben. Die hohen Expressionslevel von CRAMP sprechen aber für eine Funktion von CRAMP bei einer Infektion. Deswegen wurde ein weiteres, chronisches Infektionsmodell mit CRAMP KO und WT Mäusen getestet. Dafür wurden die Mäuse mit dem mukoiden *P. aeruginosa* Stamm NH57388A infiziert. Dieser Stamm ist ein Isolat aus einem Cystische Fibrose Patienten und verursacht bei Mäusen eine über mehrere Tage andauernde Infektion in der Lunge [126].

Die Mäuse wurden mit  $5 \times 10^8$  Bakterien infiziert und nach 24 Stunden getötet. Es wurden die Anzahl an lebenden Bakterien und die Konzentration an Zytokinen im Lungenhomogenisat sowie die Zellzusammensetzung der BAL bestimmt.

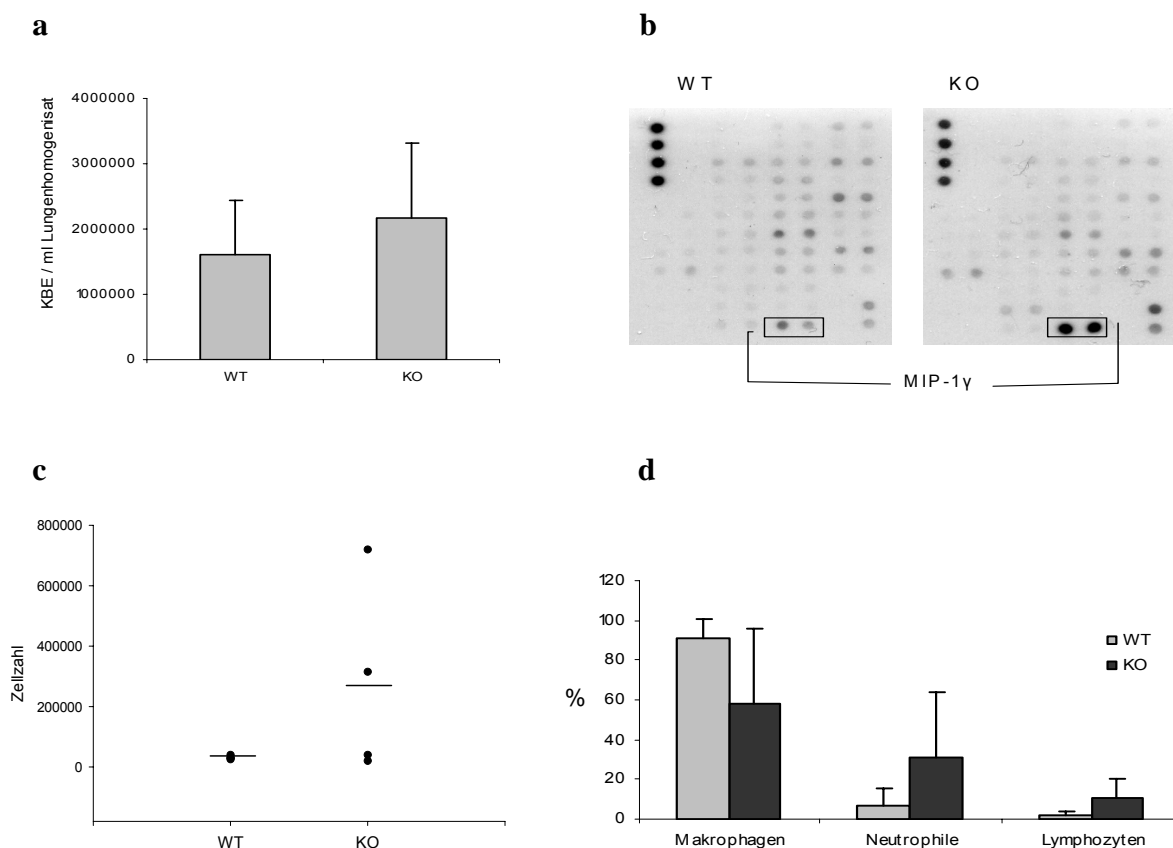
Abbildung 12a zeigt, dass die Anzahl an lebenden Bakterien in den Lungen von WT Mäusen überraschenderweise nicht niedriger, sondern deutlich höher lag als die Anzahl an lebenden Bakterien in den Lungen von KO Mäusen. Auch die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-6, KC und TNF- $\alpha$  war bei den WT Tieren höher als bei den KO Tieren (Abb. 12b). In Anzahl und Zelltyp der Zellen in der BAL unterschieden sich beide Gruppen nicht (Abb. 12c, d).



**Abb. 12: KO Mäuse können eine Infektion mit *P. aeruginosa* schneller klären als WT Mäuse.** KO und WT Mäuse wurden mit  $5 \times 10^8$  *P. aeruginosa* NH57388A infiziert. Nach 24 h wurden die Mäuse lavagiert und die Lungen entnommen. a) die rechten Lungenlappen wurden homogenisiert und die Anzahl an lebenden Bakterien durch Ausstriche geeigneter Verdünnungen bestimmt. b) Die Konzentrationen an IL-6, KC und TNF- $\alpha$  in den Lungenhomogenisaten wurde mittels ELISA bestimmt. c) Gesamtzellzahl der Zellen in der BAL d) Differentialzellzählung der Zellen in der BAL. Signifikante Unterschiede zwischen WT und KO Mäusen von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert (n = 6).

#### 4.3.3 Zu Beginn der Infektion zeigen CRAMP KO Mäuse ein verändertes Zytokinprofil und einen erhöhten Einstrom von neutrophilen Granulozyten

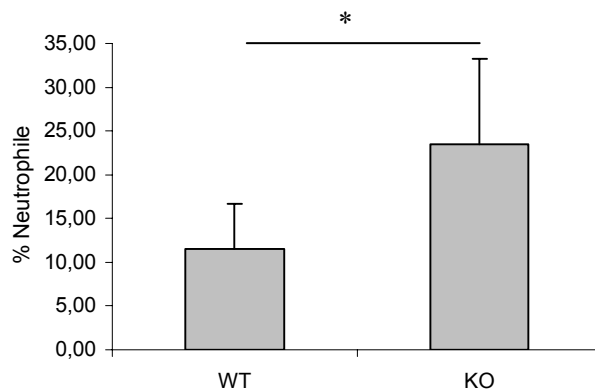
Um das Phänomen der verbesserten Bakterienabwehr in den KO Mäusen erklären zu können und Hinweise über den Verlauf der Infektion und Immunabwehr zu bekommen, wurden zunächst Infektionen unterschiedlicher Dauer durchgeführt. Als erstes wurden die Mäuse nur für zwei Stunden infiziert, um den frühen Verlauf der Immunantwort zu charakterisieren.



**Abb. 13: KO Mäuse reagieren schneller auf die Infektion mit *P. aeruginosa*.** KO und WT Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  *P. aeruginosa* NH57388A infiziert. Nach 2 h wurden die Mäuse lavagiert und die Lungen entnommen. a) Die rechten Lungenlappen wurden homogenisiert und die Anzahl an lebenden Bakterien durch Ausstriche geeigneter Verdünnungen bestimmt. b) Die BALF der KO und WT Mäuse wurden vereinigt und mittels eines Protein Arrays auf 48 Zytokine untersucht c) Gesamtzellzahl der Zellen in der BAL d) Differentialzellzählung. (n = 4)

Nach zweistündiger Infektion unterschied sich die Bakterienzahl in den Lungen noch nicht zwischen WT und KO Tieren (Abb. 13a). Analyse der BALF auf 48 Zytokine mit Hilfe eines Protein Arrays zeigte, dass die meisten Zytokine nach zwei Stunden noch nicht in detektierbarer Menge ausgeschüttet worden waren (Abb. 13b). Das einzige Zytokin, das schon in großen Mengen vorlag, ist MIP-1 $\gamma$  bei den KO Tieren. Dieses war bei den KO Tieren stark erhöht im Vergleich zu den WT Tieren (Abb. 13b). Bei Betrachtung der Zellzahl und dem Anteil neutrophiler Granulozyten in der BAL fällt auf, dass zwei Stunden nach der Infektion noch bei keinem der vier WT Tiere ein Einstrom von neutrophilen Granulozyten in die Lunge stattgefunden hat, wogegen schon zwei der KO Tiere stark erhöhte Neutrophilenzahlen in den Lungen aufwiesen (Abb. 13c und d). Ein weiterer Versuch, bei

dem die Mäuse für vier Stunden infiziert wurden, bestätigte diese Beobachtung. Vier Stunden nach der Infektion war der prozentuale Anteil an neutrophilen Granulozyten in den Lungen von KO Mäusen höher als in den Lungen von WT Mäusen (Abb. 14).

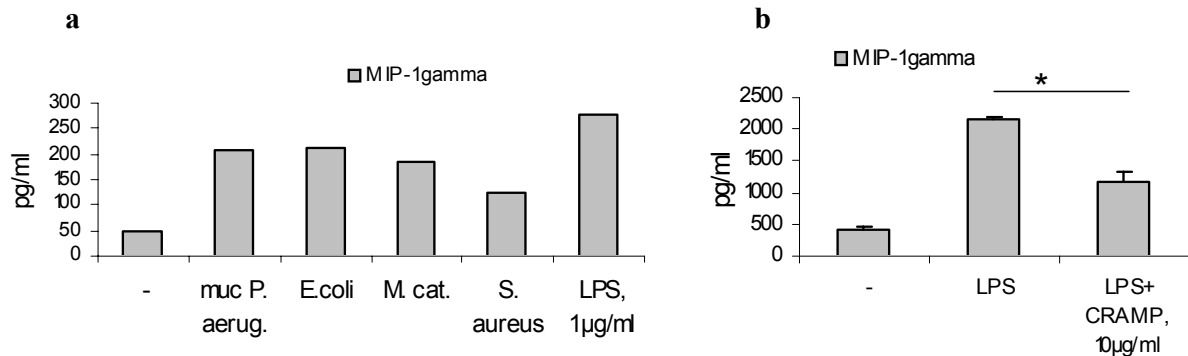


**Abb. 14: 4 h nach Infektion mit *P. aeruginosa* haben KO Mäuse einen höheren Anteil an neutrophilen Granulozyten in der Lunge als WT Mäuse.** KO und WT Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  *P. aeruginosa* NH57388A infiziert. Nach 4 h wurden die Mäuse lavagiert und Zytospins der BAL Zellen hergestellt. Durch Färbung und Differentialzellzählung wurde der Anteil an neutrophilen Granulozyten in der BAL bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen WT und KO Mäusen von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 5$ ).

### ***MIP-1 $\gamma$ wird von Epithelzellen und Makrophagen produziert***

Da sich WT und KO Mäuse nach zweistündiger Infektion mit mukoiden *P. aeruginosa* stark im MIP-1 $\gamma$  Gehalt ihrer BALF unterschieden, wurde untersucht, welche Zelltypen MIP-1 $\gamma$  produzieren und in die BALF abgegeben haben könnten. Die murine Lungenepithelzelllinie LA-4, sowie aus der Bauchhöhle von Mäusen isolierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten wurden hinsichtlich ihrer MIP-1 $\gamma$  Produktion untersucht. Abbildung 24 kann man entnehmen, dass sowohl die Atemwegsepithelzelllinie als auch Makrophagen MIP-1 $\gamma$  produzieren und sekretieren. Bei beiden Zelltypen wurde die MIP-1 $\gamma$  Abgabe durch die Inkubation mit LPS erhöht (Abb. 15). Dagegen gaben neutrophile Granulozyten weder mit noch ohne LPS Inkubation detektierbare Mengen an MIP-1 $\gamma$  ab (Daten nicht gezeigt). In der Zelllinie LA-4 wurde die MIP-1 $\gamma$  Abgabe außer durch LPS auch durch mukoiden *P. aeruginosa* und andere Bakterien induziert (Abb. 15a). Bei den Makrophagen wurde zusätzlich untersucht, ob die durch LPS induzierte MIP-1 $\gamma$  Abgabe durch Zugabe von

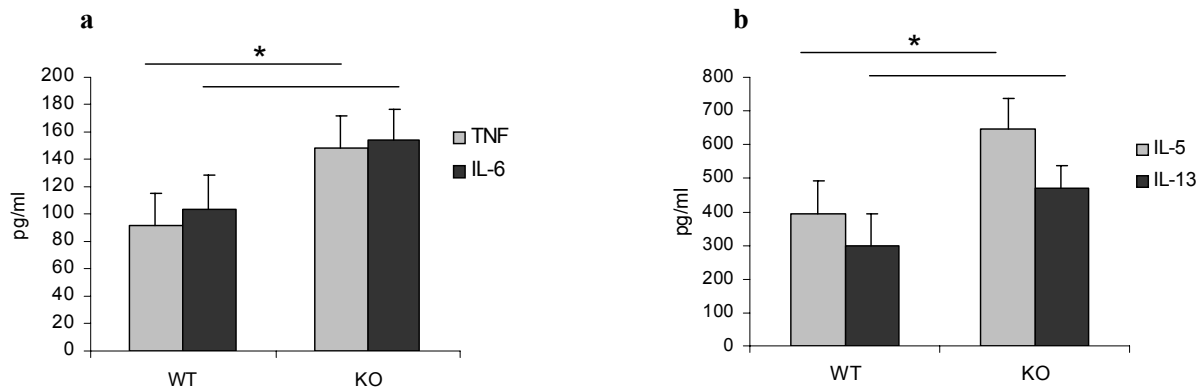
CRAMP inhibiert werden kann, wie das bei der Abgabe proinflammatorischer Zytokine der Fall ist (vergleiche Kapitel 4.5). Tatsächlich senkte die Zugabe von 10 µg/ml CRAMP die MIP-1γ Abgabe (Abb. 15b).



**Abb. 15: MIP-1γ wird von Epithelzellen und Makrophagen produziert und durch LPS induziert.** a) Die murine Atemwegsepithelzelllinie LA-4 wurde mit LPS oder hitzegetöteten Bakterien für 18 h inkubiert und die MIP-1γ Abgabe in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt. b) Thioglykollat induzierte, peritoneale Makrophagen wurden mit LPS oder LPS und 10 µg/ml CRAMP für 24 h inkubiert und MIP-1γ in den Überständen bestimmt. Signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe von P < 0,05 sind mit \* markiert (n = 3). (muc P. aerug.: mukoide *P. aeruginosa*; M. cat. : *M. catarrhalis*)

#### 4.3.4 Noch sieben Tage nach der Infektion unterscheidet sich die Zytokinabgabe von CRAMP KO und WT Mäusen

Zusätzlich wurden einige Mäuse erst sieben Tage nach der Infektion getötet, um den Langzeitverlauf der Infektion zu untersuchen. Auch nach sieben Tagen konnten noch *P. aeruginosa* aus den Lungen der Mäuse isoliert werden. Allerdings unterschieden sich KO und WT Mäuse hinsichtlich der Bakterienzahl nicht (Daten nicht gezeigt). Auch hinsichtlich der Zellzahl und Zellzusammensetzung der BAL waren keine Unterschiede zwischen WT und KO Mäusen sichtbar (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 16: KO Mäuse haben 7 Tage nach Infektion mit *P. aeruginosa* höhere Zytokinlevel als WT Mäuse.** KO und WT Mäuse wurden mit  $1 \times 10^8$  *P. aeruginosa* NH57388A infiziert. Nach sieben Tagen wurden die Lungen entnommen und homogenisiert. Die Konzentrationen an IL-6 und TNF- $\alpha$  (a) und die Konzentrationen an IL-5 und IL-13 (b) in den Lungenhomogenisaten wurden mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zwischen WT und KO Mäusen von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 4$ ).

Bei Messung der Zytokine im Lungenhomogenisat zeigte sich, dass die KO Mäuse sieben Tage nach der Infektion höhere Zytokinkonzentrationen hatten als die WT Mäuse und zwar sowohl an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-6 (Abb. 16a), als auch an den antiinflammatorischen Zytokinen IL-5 und IL-13 (Abb. 16b). Dies ist im Gegensatz zu den erniedrigten Zytokinwerten der KO Tiere nach einem Tag Infektion (vgl. Abb. 12b).

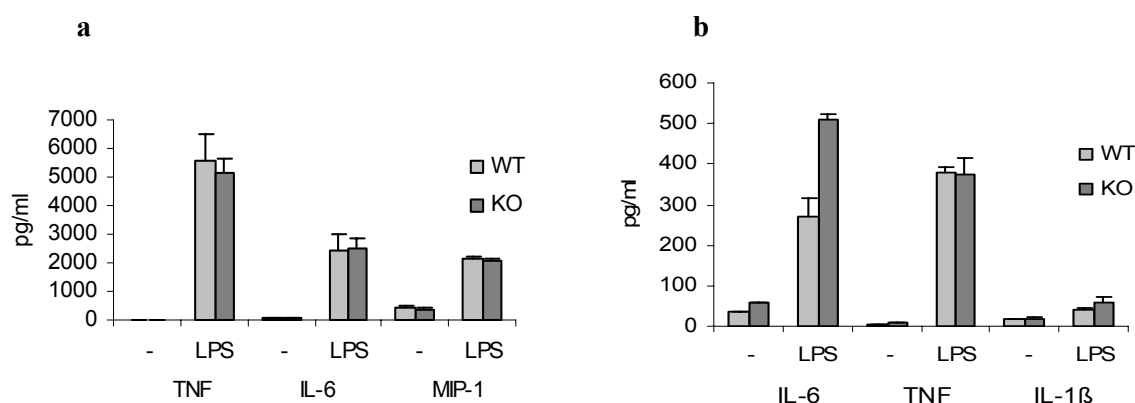
#### 4.4 Untersuchung von Immunzellen aus WT und CRAMP KO Mäusen

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.3.2 zeigen einen unerwarteten Phänotyp der KO Mäuse. Statt einer verzögerten Klärung der Infektion können sie die Bakterien schneller aus ihren Lungen entfernen als WT Tiere. Gleichzeitig haben KO Tiere nach 24 Stunden auch niedrigere Zytokinkonzentrationen als die WT Tiere. Die Daten aus den Infektionen für zwei und vier Stunden deuten darauf hin, dass die KO Tiere auf den bakteriellen Reiz hin schneller mit einem Einstrom an neutrophilen Granulozyten in die Lunge reagieren als die WT Tiere. Die verringerten Bakterienzahlen in den Lungen der KO Mäuse könnten aber auch durch eine gesteigerte Aktivität der Immunzellen zustande gekommen sein. Deswegen wurden als nächstes Makrophagen und neutrophile Granulozyten von WT und KO Mäusen verglichen.



#### 4.4.1 Die Zytokinabgabe von Immunzellen aus CRAMP KO und WT Mäusen unterscheidet sich nicht

Makrophagen und neutrophile Granulozyten wurden aus der Bauchhöhle von WT und CRAMP KO Mäusen isoliert, mit LPS inkubiert und die Abgabe der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF-alpha sowie von MIP-1 $\gamma$  verglichen.



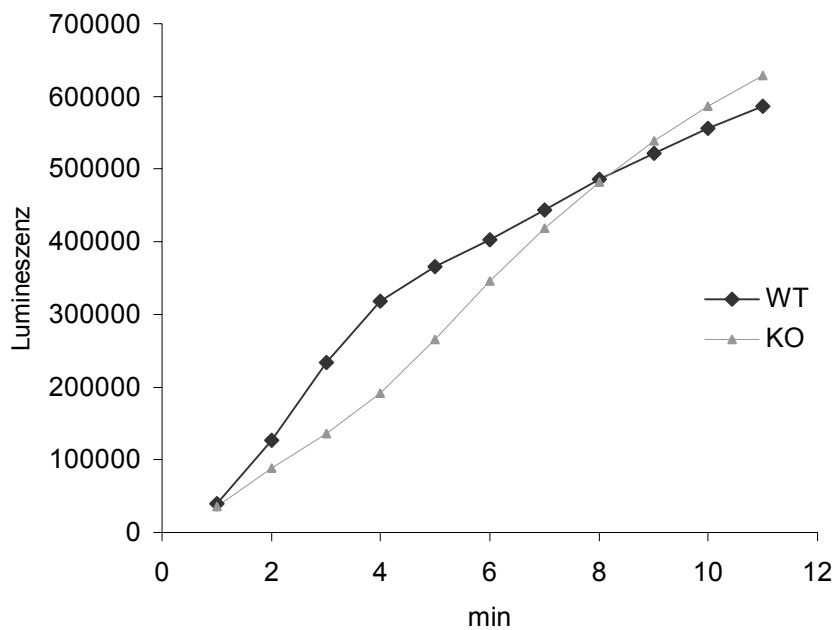
**Abb. 17: Die Zytokinabgabe von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten aus WT und KO Mäusen unterscheidet sich nicht.** Makrophagen (a) und neutrophile Granulozyten (b) wurden nach Thioglykollat Injektion aus den Bauchhöhlen von WT und KO Mäusen isoliert. Die isolierten Zellen wurden mit LPS stimuliert und die Abgabe von Zytokinen im ELISA bestimmt. (n = 3)

Abbildung 17 kann entnommen werden, dass sich Makrophagen und neutrophile Granulozyten nicht in ihrer Fähigkeit zur Zytokinabgabe auf einen bakteriellen Reiz hin unterscheiden. Auch die Menge der auf den LPS Reiz hin abgegebenen Zytokine unterschied sich nicht zwischen Zellen aus WT und aus KO Tieren.

#### 4.4.2 Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies unterscheidet sich nicht zwischen neutrophilen Granulozyten aus WT und KO Mäusen

Da neutrophile Granulozyten die ersten Zellen sind, die bei einer Infektion ins infizierte Gewebe einwandern und für einen Großteil des Abtötens der Bakterien verantwortlich sind, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, um herauszufinden, ob sich neutrophile

Granulozyten aus WT und KO Mäusen generell unterscheiden. Es wurde überprüft, ob sich die neutrophilen Granulozyten aus WT und KO Mäusen in ihrer Fähigkeit, RSS zu produzieren, unterscheiden. Dazu wurden neutrophile Granulozyten aus der Bauchhöhle von WT und KO Mäusen isoliert, mit PMA stimuliert und ihre RSS Produktion gemessen. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, unterscheiden sich frisch isolierte neutrophile Granulozyten aus WT und KO Mäusen nicht in ihrer Fähigkeit RSS zu bilden.



**Abb. 18: Die RSS Produktion von neutrophilen Granulozyten aus KO und WT Mäusen unterscheidet sich nicht.** Neutrophile Granulozyten wurden 4 h nach Thioglykollat Injektion aus den Bauchhöhlen von WT und KO Mäusen isoliert. Die isolierten Zellen wurden mit PMA stimuliert und ihre RSS Produktion durch Umsetzung des Substrats L-012 bestimmt. (n = 3)

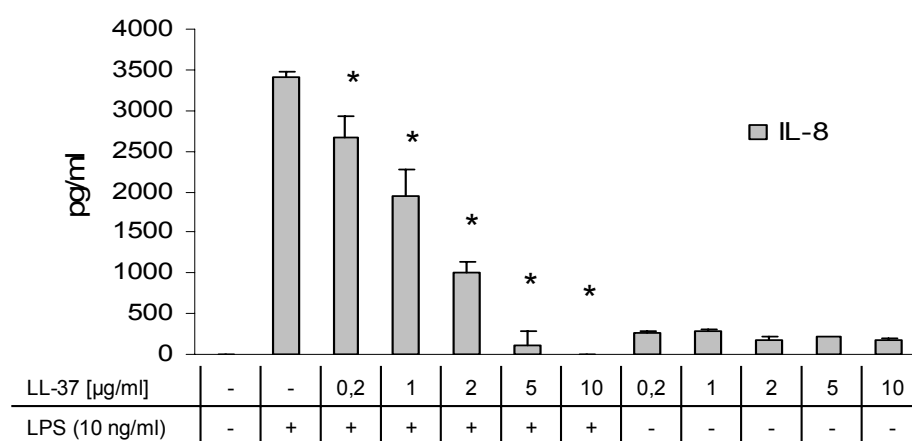
#### 4.5 Einfluss von LL-37 und CRAMP auf Immunzellen in vitro

Da bei den in Kapitel 4.4 durchgeführten Experimenten kein Unterschied zwischen den Immunzellen aus CRAMP KO und WT Tieren sichtbar wurde, sollten als nächstes die Auswirkungen von außerhalb der Zelle vorliegendem LL-37 und CRAMP auf verschiedene Immunzellen untersucht werden. Schon kurz nach der Entdeckung der Cathelicidine war bekannt, dass diese neben ihrer antimikrobiellen Aktivität auch LPS binden können. LPS ist

einer der potentesten bakteriellen Aktivatoren der angeborenen Immunität. Es wird über TLR4 und CD14 von zahlreichen Immunzellen erkannt und führt zu deren Aktivierung [127]. Als erstes wurde deswegen der Einfluss von LL-37 und CRAMP auf die Aktivierung von Immunzellen durch LPS untersucht.

#### 4.5.1 LL-37 inhibiert die Aktivierung von humanen Makrophagen durch LPS

Zunächst wurden die beiden humanen Makrophagenzelllinien U937 und Mono Mac 6 verwendet. Die Zellen wurden mit LPS stimuliert und es wurde überprüft, wie sich die gleichzeitige Gabe von LL-37 auf die Sekretion von IL-8 auswirkt.



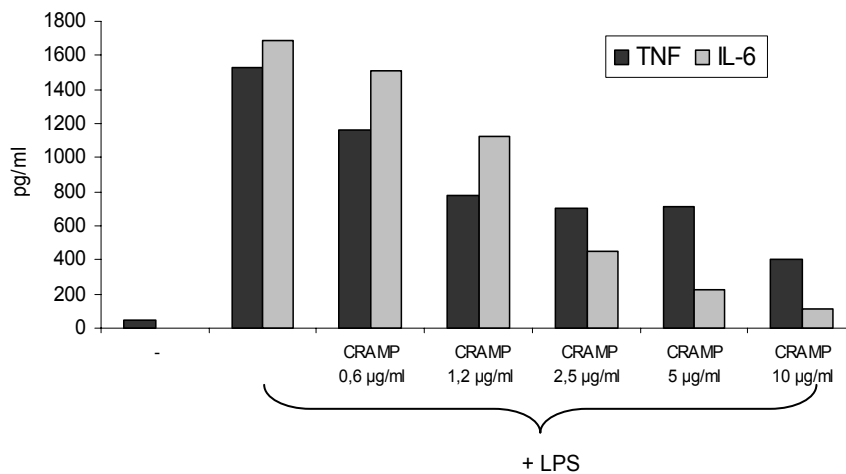
**Abb. 19: Die Aktivierung von Makrophagen wird durch LL-37 gehemmt.** Die humane Makrophagenzelllinie U937 wurde für 24 h mit 10 ng/ml LPS und / oder den angegebenen Konzentrationen LL-37 inkubiert. Abgegebenes IL-8 wurde in den Überständen mittels ELISA gemessen. Signifikante Unterschiede zu den nur mit LPS stimulierten Zellen von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 3$ ).

Da sich beide Zelllinien sehr ähnlich verhielten, sind in Abbildung 19 nur die Daten für die Zelllinie U937 gezeigt. Die Stimulation mit 10 ng/ml LPS führte in beiden Zelllinien zu einer starken IL-8 Abgabe (Abb. 19). LL-37 alleine hatte dagegen kaum Einfluss auf die IL-8 Abgabe und führte zu Werten, die gegenüber den unstimulierten Kontrollzellen nur schwach erhöht waren. Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit LPS und LL-37 führt zu einer Verringerung der IL-8 Sekretion gegenüber der Stimulation nur mit LPS (Abb. 19). Diese Verringerung durch CRAMP war konzentrationsabhängig und führte bei Zugabe von 10

µg/ml LL-37 zu einer kompletten Reduktion der IL-8 Abgabe auf das Niveau der unstimulierten Kontrollzellen.

#### 4.5.2 CRAMP inhibiert die Aktivierung von murinen Makrophagen durch LPS

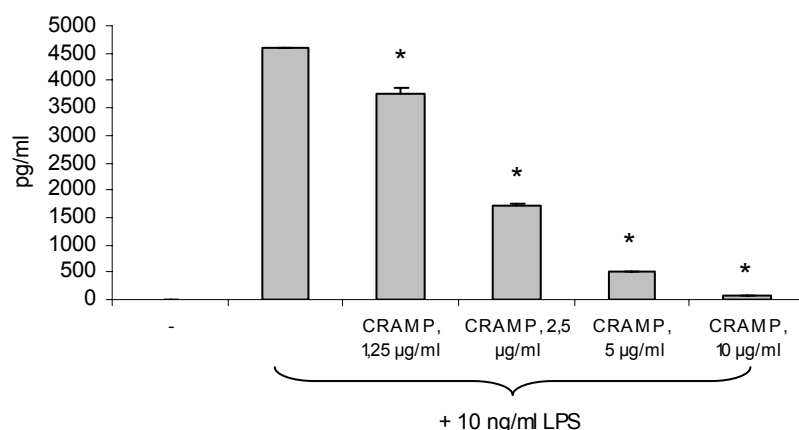
Als nächstes sollte untersucht werden, ob CRAMP einen ähnlichen Einfluss auf die Aktivierung von murinen Makrophagen hat wie LL-37 auf humane Zellen. Dies wurde zuerst an den murinen Makrophagenzelllinien RAW 264.7 und J774 untersucht.



**Abb. 20:** Die LPS induzierte Zytokinabgabe von Mausmakrophagen wird durch CRAMP gehemmt. Die Zelllinie J774 wurde mit 100 ng/ml LPS und den angegebenen Konzentrationen CRAMP inkubiert. Nach 24 h wurden IL-6 und TNF-α in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen.

Abbildung 20 zeigt, dass Stimulation der Makrophagenzelllinie J774 mit 100 ng/ml LPS zu einer starken IL-6 und TNF-α Abgabe führt. Diese wird durch gleichzeitige Inkubation mit CRAMP konzentrationsabhängig inhibiert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit der Zelllinie RAW 264.7 erzielt (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes wurde untersucht, ob derselbe Effekt auch bei frisch aus der Bauchhöhle von Mäusen isolierten Makrophagen zu sehen ist. Makrophagen aus WT Mäusen wurden für 24 Stunden mit LPS und verschiedenen Konzentrationen CRAMP stimuliert und die Abgabe von TNF-α bestimmt.



**Abb. 21: Die LPS induzierte TNF- $\alpha$  Abgabe von Makrophagen wird durch CRAMP inhibiert.** Makrophagen wurden 3 Tage nach Thioglykollat Injektion aus der Bauchhöhle von WT Mäusen isoliert. Die isolierten Zellen wurden mit 10 ng/ml LPS und den angegebenen Konzentrationen CRAMP für 24 h inkubiert. Die TNF- $\alpha$  Konzentration in den Überständen wurde mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zu den nur mit LPS stimulierten Zellen von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 3$ ).

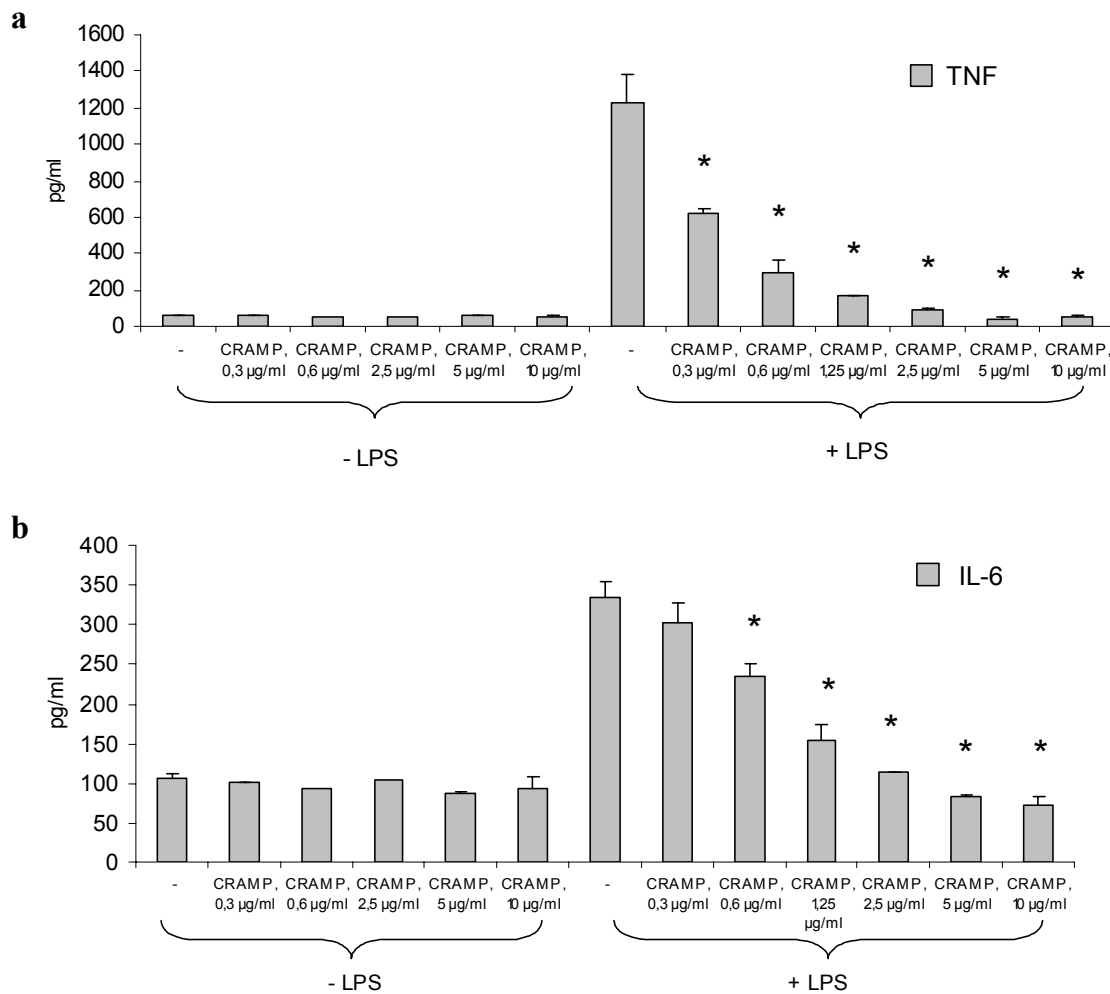
Abbildung 21 kann man entnehmen, dass sich peritoneale Makrophagen ganz ähnlich wie die Zelllinien verhielten. Stimulation mit 10 ng/ml LPS führte zu einer starken TNF- $\alpha$  Abgabe. Diese wurde durch die Zugabe von CRAMP konzentrationsabhängig gehemmt und führte bei Zugabe von 10 µg/ml CRAMP zu einer fast vollständigen Unterdrückung der TNF- $\alpha$  Sekretion (Abb. 21).

#### 4.5.3 CRAMP hemmt die Zytokin Abgabe von murinen neutrophilen Granulozyten

Als nächstes wurde untersucht, wie neutrophile Granulozyten auf die Inkubation mit LPS und CRAMP reagieren. Hierfür wurden neutrophile Granulozyten aus der Bauchhöhle von Mäusen isoliert und mit LPS und CRAMP inkubiert. Nach vier Stunden wurde die TNF- $\alpha$  und IL-6 Konzentrationen in den Überständen bestimmt.

Es zeigte sich, dass eine vierstündige LPS Inkubation schon zu einer recht starken TNF- $\alpha$  Ausschüttung (Abb. 22a) und einer etwas geringeren IL-6 Abgabe (Abb. 22b) führte. Diese wurden durch Zugabe von CRAMP konzentrationsabhängig gehemmt (Abb. 22a, b). Dabei genügten geringere CRAMP Konzentrationen als zur Hemmung der Aktivierung von Makrophagen (vgl. Abb. 21). Schon ab einer Konzentration von 0,3 µg/ml CRAMP konnte eine Inhibierung der Zytokinabgabe neutrophiler Granulozyten beobachtet werden. Ab einer

CRAMP Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  fand keine Aktivierung der Zytokinabgabe durch LPS mehr statt. Die Zytokinabgabe war dann nicht höher als bei den unstimulierten Kontrollzellen. Inkubation der neutrophilen Granulozyten nur mit CRAMP hatte keinen Einfluss auf die Abgabe von IL-6 und TNF-alpha (Abb. 22a, b).



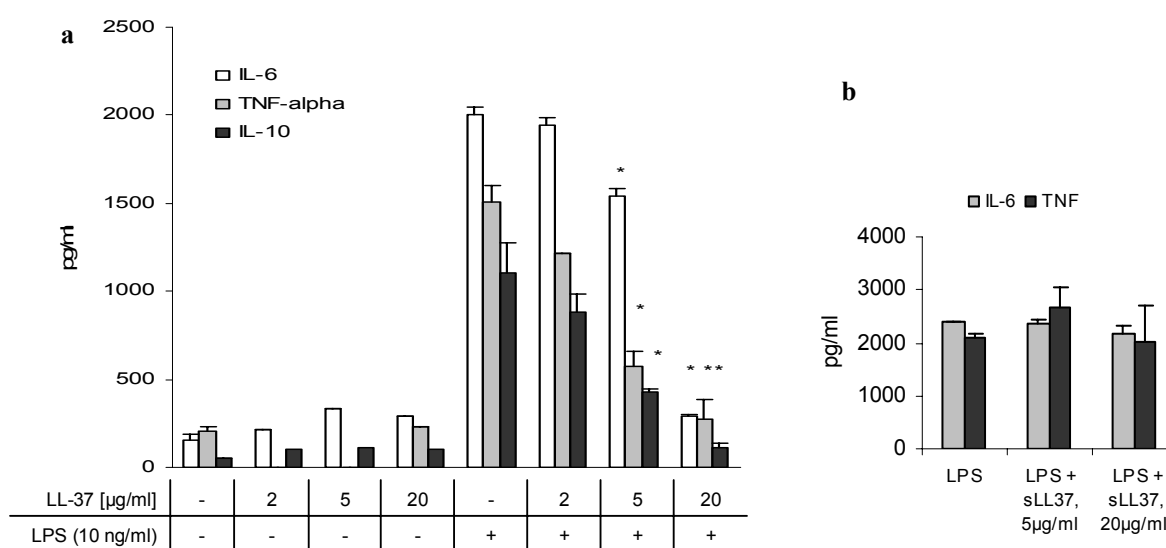
**Abb. 22: Die LPS induzierte TNF- $\alpha$  und IL-6 Abgabe von neutrophilen Granulozyten wird durch CRAMP inhibiert.** Neutrophile Granulozyten wurden 4 h nach Thioglykollat Injektion aus der Bauchhöhle von WT Mäusen isoliert. Die isolierten Zellen wurden mit oder ohne 100 ng/ml LPS und den angegebenen Konzentrationen CRAMP für 4 h inkubiert. Die TNF- $\alpha$  (a) und IL-6 (b) Konzentration in den Überständen wurden mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zu den nur mit LPS stimulierten Zellen von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 3$ ).

#### 4.5.4 LL-37 inhibiert die Reifung von DZ durch LPS

Neben den Wirkungen von LL-37 und CRAMP auf die Aktivierbarkeit von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten durch LPS, sollte auch der Einfluss von LL-37 auf DZ untersucht werden. DZ verbinden die angeborene und adaptive Immunantwort und werden durch LPS und andere bakterielle Bestandteile sowie Zytokine aktiviert [128,129]. Zur Generierung von DZ wurden Monozyten aus Blut aufgereinigt und in Zellkulturschalen durch die Zugabe von IL-4 und GM-CSF über eine Woche zu unreifen DZ ausdifferenziert.

##### *Die Abgabe typischer Zytokine wird durch LL-37 inhibiert*

Um den Einfluss von LL-37 auf die Aktivierung von DZ durch LPS zu untersuchen, wurden unreife DZ mit LPS und verschiedenen Konzentrationen an LL-37 stimuliert und zunächst die Zytokinabgabe der DZ bestimmt.



**Abb. 23: LL-37 hemmt die Zytokinabgabe von DZ.** a) Unreife DZ wurden mit 10 ng/ml LPS und / oder verschiedenen Konzentrationen LL-37 inkubiert. Nach 48 h wurde die Abgabe der Zytokine IL-6, IL-10 und TNF- $\alpha$  durch ELISA bestimmt. b) Zur Kontrolle wurden DZ mit 10 ng/ml LPS und 5 / 20 µg/ml des Kontrollpeptids sLL-37 inkubiert. IL-6 und TNF- $\alpha$  im Überstand wurden mittels ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zu den nur mit LPS stimulierten Zellen von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 4$ ).

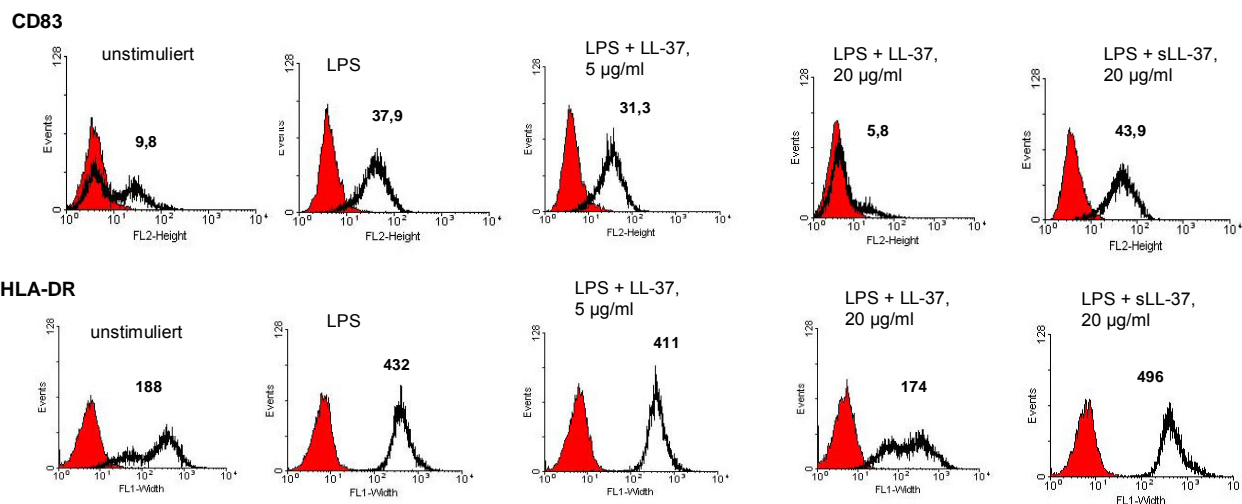
Stimulation der DZ mit 10 ng/ml LPS führte zu einer starken Abgabe von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 (Abb. 23a). Die Inkubation mit LL-37 alleine hatte keinen Einfluss auf die

Zytokinabgabe. Dagegen wurde die LPS induzierte Abgabe durch gleichzeitige Gabe von LL-37 konzentrationsabhängig gehemmt und erreichte bei Zugabe von 20 µg/ml LL-37 fast das Niveau der unstimulierten Kontrolle (Abb. 23a). Stimulation mit 10 ng/ml LPS führte zu keiner messbaren Abgabe von IL-12p70. Bei Verwendung von 100 ng/ml LPS wurde dagegen auch IL-12p70 abgegeben. Auch diese Abgabe konnte durch die Zugabe von LL-37 gehemmt werden (Daten nicht gezeigt). Um eine unspezifische Wirkung von LL-37, die nur auf die Ladung der Aminosäuren zurückzuführen ist, auszuschließen, wurde das gleiche Experiment auch mit einem Kontrollpeptid, sLL-37, gemacht, das dieselben Aminosäuren in anderer Reihenfolge enthält. Dieses Peptid hatte keinerlei Einfluss auf die durch LPS ausgelöste Zytokinabgabe der DZ (Abb. 23b).

### ***Die Expression von Oberflächenmarkern wird durch LL-37 gehemmt***

Ein weiteres Merkmal aktivierter DZ ist die erhöhte Expression spezifischer Oberflächenmoleküle. Es wurde die Expression von CD83, einem Oberflächenmarker, der spezifisch für reife DZ ist, und von HLA-DR, den MHC Klasse II Molekülen, die schon auf unreifen DZ vorhanden, aber bei Reifung der Zellen noch vermehrt werden, untersucht. Im Gegensatz dazu wird die Expression von CD14 bei der Reifung von Monozyten zu DZ stark vermindert. Mit LPS aktivierte DZ wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen diese drei Oberflächenmarker inkubiert und die Bindung der Antikörper in einer FACS Analyse bestimmt. Wieder wurden DZ, die nur mit LPS inkubiert wurden, mit DZ verglichen, die mit LPS und LL-37 inkubiert wurden.





**Abb. 24: LL-37 inhibiert die Expression von CD83 und HLA-DR.** DZ wurden für 48 h mit LPS, LPS und LL-37 oder LPS und sLL-37 inkubiert. Die CD83 und HLA-DR Expression wurde mittels FACS Analyse untersucht. Die grau gefüllte Fläche gibt die unspezifische Färbung durch die Isotypkontrolle an; die dick schwarz umrandete Fläche stellt die Fluoreszenz der mit Antikörper markierten Zellen dar.

Sowohl die CD83 wie auch die HLA-DR Expression wurden durch die Inkubation mit 10 ng/ml LPS verstärkt (Abb. 24). Dies wurde durch die gleichzeitige Inkubation mit LL-37 gehemmt, wobei 5 µg/ml LL-37 allerdings noch kaum Wirkung zeigte. Durch Inkubation mit 20 µg/ml LL-37 und LPS war die Verstärkung der Expression der Oberflächenmarker dagegen vollständig inhibiert und nicht anders als bei den unstimulierten Kontrollzellen (Abb. 24). Auch in diesem Experiment wurden Zellen zur Kontrolle mit LPS und 20 µg/ml sLL-37 inkubiert. Diese Zellen unterschieden sich in der CD83 und HLA-DR Expression nicht von den Zellen, die nur mit LPS inkubiert worden waren (Abb. 24). Die CD14 Expression war bei unreifen DZ sehr gering und bei mit LPS stimulierten DZ gar nicht mehr vorhanden (Daten nicht gezeigt).

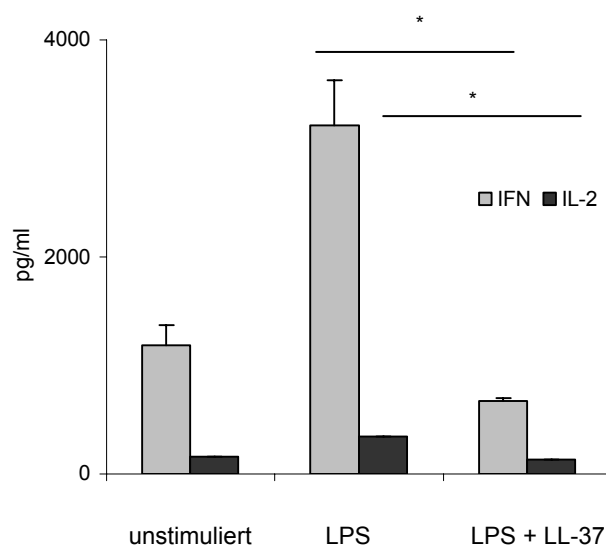
### ***LL-37 inhibiert die Aktivierung von T-Zellen durch DZ***

Eine Eigenschaft reifer DZ ist die Aktivierung naiver T-Zellen. Aktivierte T-Zellen zeichnen sich durch die Abgabe von IL-2 und IFN-γ aus. Es sollte untersucht werden, ob die Inkubation DZ mit LPS und 20 µg/ml LL-37 auch deren Aktivierung von T-Zellen beeinflusst. Dazu wurden DZ für 48 Stunden mit LPS oder mit LPS und LL-37 inkubiert und anschließend für

weitere 72 Stunden zusammen mit naiven T-Zellen kultiviert. In den Überständen der Cokulturen wurden die Konzentrationen an IL-2 und IFN- $\gamma$  mittels ELISA bestimmt.

Es zeigte sich, dass die Kultivierung von T-Zellen mit unstimulierten DZ nur zu einer geringen Abgabe von IL-2 und IFN- $\gamma$  führte (Abb. 25). In den Cokulturen von T-Zellen und DZ, die nur mit LPS inkubiert worden waren, konnten dagegen stark erhöhte Konzentrationen an IL-2 und IFN- $\gamma$  nachgewiesen werden. Die Kultivierung von T-Zellen mit DZ, die mit LPS und 20  $\mu$ g/ml LL-37 vorinkubiert worden waren, führte dagegen zu einer sehr geringen IL-2 und IFN- $\gamma$  Abgabe, die sogar leicht unter der der Kontrolle lag (Abb. 25). Die Cokultur und die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in den Überständen wurden von Peter Kleemann, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Philipps-Universität Marburg, durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass DZ, die in Gegenwart von LL-37 mit LPS stimuliert werden, auch in ihrer Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren inhibiert sind.



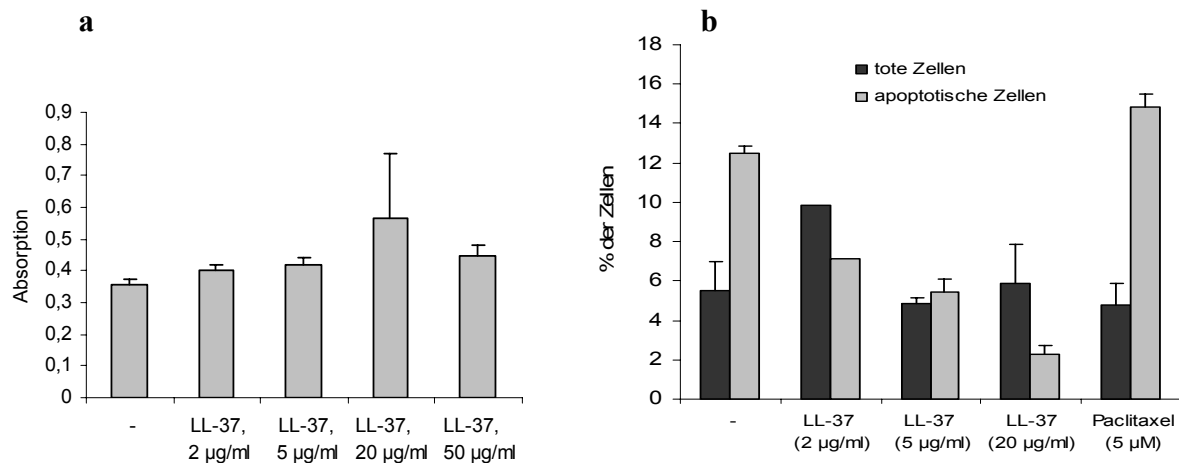
**Abb. 25: LL-37 führt zu verminderter T-Zell Aktivierung durch DZ.** DZ wurden mit 10 ng/ml LPS +/- 20  $\mu$ g/ml LL-37 für 48 h inkubiert. Diese Zellen wurden dann für 72 h mit allogenen naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert und die Abgabe von IL-2 und IFN- $\gamma$  im ELISA bestimmt. Signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert (n = 3).

#### **4.5.5 Die bekannten Signalwege von LL-37 sind nicht an der inhibitorischen Wirkung von LL-37 auf die Aktivierung von DZ beteiligt**

Um herauszufinden, ob LL-37 an einen eigenen Rezeptor bindet und über eine Signalkaskade seine inhibitorische Wirkung ausübt, wurden einige Inhibitoren von Signalwegen, die mit LL-37 in Verbindung gebracht werden, auf ihre Beeinflussung der Wirkung von LL-37 getestet. Ein bekannter Rezeptor von LL-37 ist FPRL1 [70]. Da dies ein G-Protein gekoppelter Rezeptor ist, wurde Pertussis Toxin als Inhibitor verwendet. Außerdem wurde PD98059, ein MEK Inhibitor verwendet. MEK befindet sich in der Signaltransduktion downstream von Rezeptor Tyrosin Kinasen wie dem EGF Rezeptor. Auch die Aktivierung dieses Signalwegs durch LL-37 konnte schon gezeigt werden [130]. Außerdem wurden LY294002, ein PI-3 Kinase Inhibitor und der Protein Kinase C Inhibitor GF109203X verwendet. Keiner dieser Inhibitoren konnte die durch 20 µg/ml LL-37 und LPS auf ein Minimum gedrückte Zytokinabgabe der DZ anheben. Eine Signalweiterleitung von LL-37 durch Bindung an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor wie FPRL1 oder durch Transaktivierung des EGF Rezeptors, sowie die Beteiligung der Signalwege über Aktivierung der Protein Kinase C oder der PI-3 Kinase an der Weiterleitung eines hemmenden Signals durch LL-37 können damit weitgehend ausgeschlossen werden.

#### **4.5.6 LL-37 ist für unreife DZ nicht toxisch**

In hohen Konzentrationen ist LL-37 auch für einige humane Zellen toxisch [65,67]. Deswegen sollte als nächstes ausgeschlossen werden, dass die beobachtete Hemmung der Aktivierung von DZ durch LL-37 ein Artefakt, hervorgerufen durch den Tod der DZ, war. Dafür wurde zum einen die Anzahl an lebenden Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit LL-37 durch Umsetzung des Lumineszenz freisetzenden Substrats WST-1 gemessen. Zum anderen wurde durch Färbung mit Propidium Iodid (färbt tote Zellen) und Annexin V (bindet an apoptotische Zellen) und Detektion der gefärbten Zellen mittels FACS die Anzahl an toten und apoptotischen Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit LL-37 bestimmt.



**Abb. 26: LL-37 ist nicht toxisch für DZ.** a) DZ wurden für 24 h mit LL-37 inkubiert. Die Anzahl lebender Zellen wurde durch Umsetzung von WST-1 bestimmt und mit den unbehandelten Kontrollzellen verglichen. b) DZ wurden für 48 h mit LL-37 inkubiert und durch Färbung mit Propidium Iodid und Annexin V die Anteile an toten und apoptotischen Zellen bestimmt. 5 µM Paclitaxel diente als Positivkontrolle für Apoptose.

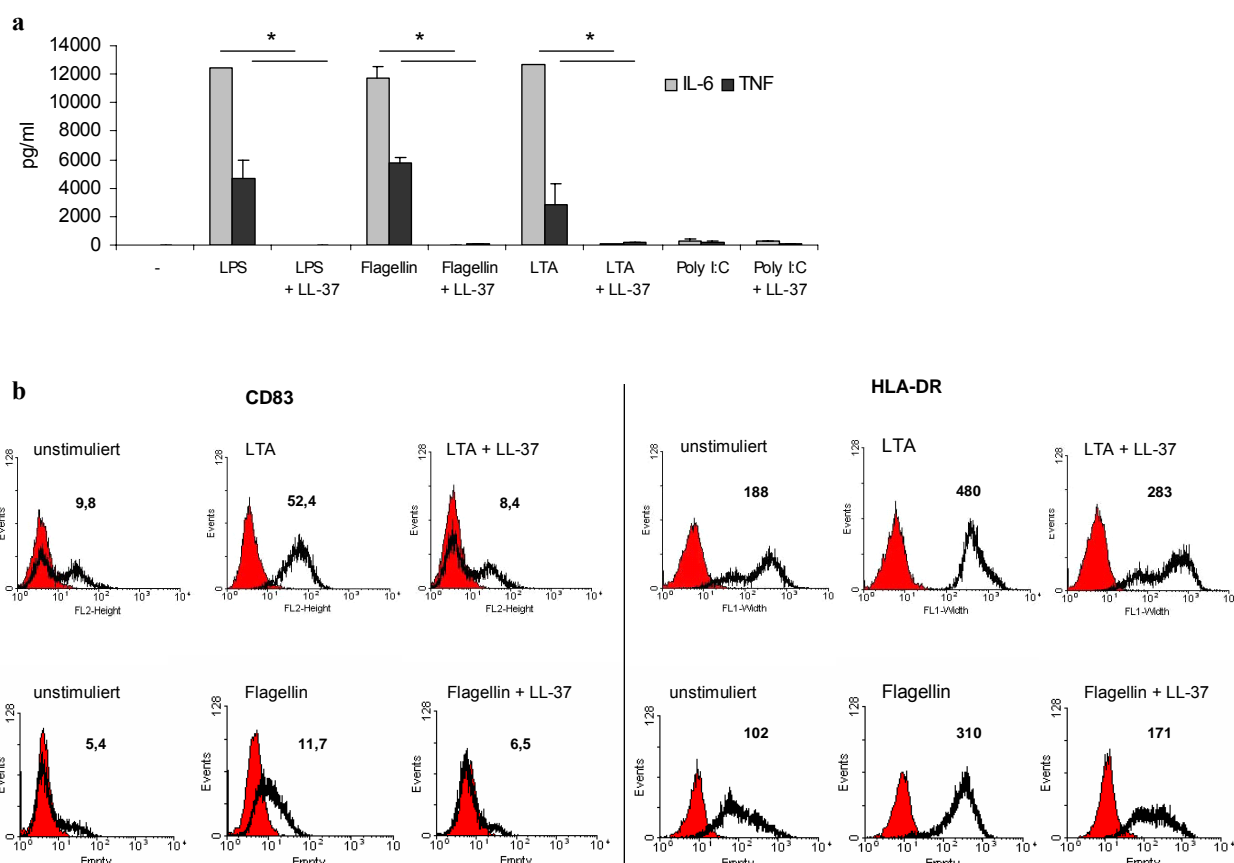
Bei der Umsetzung von WST-1 konnte keine Abnahme an lebenden Zellen durch die Inkubation mit LL-37 festgestellt werden (Abb. 26a). Auch die Färbung mit Propidium Iodid und Annexin V zeigte keine Zunahme an toten oder apoptotischen Zellen durch die Inkubation mit LL-37 (Abb. 26b). Der Anteil an apoptotischen Zellen nahm durch die Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen an LL-37 sogar ab (Abb. 26b).

#### 4.5.7 LL-37 inhibiert die Aktivierung von DZ durch TLR2 und TLR5 Liganden

Als nächstes sollte untersucht werden, ob der inhibitorische Effekt von LL-37 auf DZ auf die Aktivierung durch LPS beschränkt ist, oder ob auch die Aktivierung von DZ über andere Stimuli durch LL-37 beeinflusst wird. LPS aktiviert DZ durch Bindung an TLR4. Als erstes sollten deswegen weitere TLR Liganden auf ihre Fähigkeit DZ zu aktivieren und auf ihre Beeinflussung durch LL-37 untersucht werden. Verwendet wurden LTA als Ligand für TLR2, Flagellin als Ligand für TLR5 und Poly I:C als Ligand für TLR3. Als Parameter für die Aktivierung der DZ dienten wieder die Zytokinabgabe und die Oberflächenexpression von CD83 und HLA-DR.

Abbildung 27a zeigt, dass die Stimulation von unreifen DZ sowohl mit Flagellin als auch mit LTA zu einer erhöhten Zytokinausschüttung führte, die der Aktivierung durch LPS ähnlich

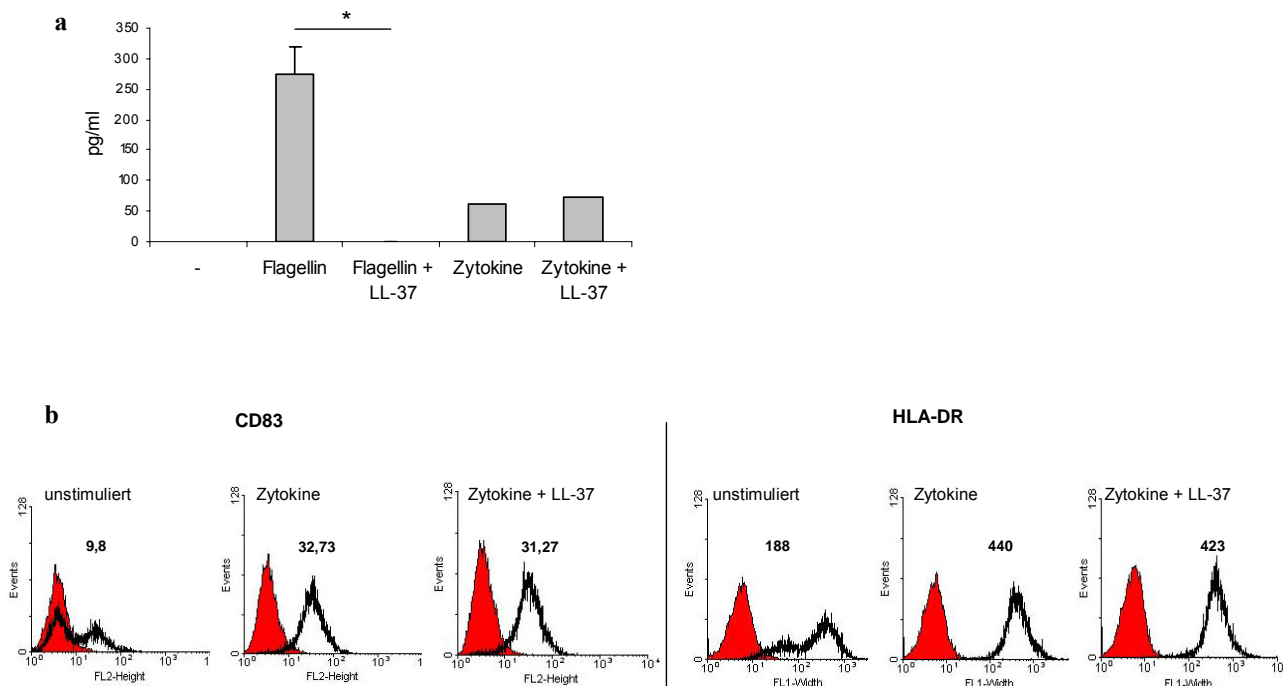
ist. Genau wie bei LPS konnte diese Zytokinausschüttung durch die gleichzeitige Inkubation mit 20 µg/ml LL-37 vollständig inhibiert werden. Poly I:C dagegen führte nur zu einer äußerst geringen Abgabe von Zytokinen. In der gewählten Konzentration war es nicht fähig, die DZ zu aktivieren. Die FACS Analyse der Expression von CD83 und HLA-DR wurde deswegen nur mit DZ, die mit LTA oder Flagellin stimuliert wurden, durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Inkubation mit LTA zu einer starken Expression von CD83 und HLA-DR führte (Abb. 27b). Flagellin führte zu einem etwas schwächeren, aber immer noch deutlichem Anstieg der Expression der beiden Oberflächenmarker. Sowohl die durch Flagellin als auch die durch LTA induzierte Expression wurde durch die gleichzeitige Inkubation mit 20 µg/ml LL-37 inhibiert (Abb. 27b).



**Abb. 27: Die Aktivierung von DZ durch TLR Liganden wird durch LL-37 gehemmt.** DZ wurden mit 10 µg/ml LTA, 100 ng/ml Flagellin oder 25 µg/ml poly I:C für 48 h stimuliert. Diese Stimuli wurden alleine oder mit 20 µg/ml LL-37 verwendet. a) IL-6 und TNF-α wurden in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen. Signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe von  $P < 0,05$  sind mit \* markiert ( $n = 3$ ). b) Die Expression von CD83 und HLA-DR wurde mittels FACS analysiert. Die grau gefüllte Fläche gibt die unspezifische Färbung durch die Isotypkontrolle an; die dick schwarz umrandete Fläche stellt die Fluoreszenz der mit Antikörper markierten Zellen dar. (die Flagellin Daten stammen aus Zusammenarbeit mit Renat Shaykhiev)

#### 4.5.8 LL-37 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von DZ durch Zytokine

Die Daten aus dem vorangegangenen Kapitel zeigen, dass LL-37 nicht nur die Aktivierung von DZ durch LPS sondern auch durch LTA und Flagellin, Liganden der TLR2 und 5, verhindern kann. Als nächstes stellte sich die Frage, ob die Inhibierung der Aktivierung von DZ durch LL-37 auf TLR Liganden beschränkt ist. In einem weiteren Experiment wurde daher ein Zytokinmix, bestehend aus IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ , für die Aktivierung der unreifen DZ verwendet. Es wurden die IL-12p70 Abgabe und die Expression von CD83 und HLA-DR gemessen.



**Abb. 28: LL-37 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von DZ durch Zytokine.** DZ wurden für 48 h mit 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 150 ng/ml IL-6 und 10 ng/ml TNF- $\alpha$  +/- 20  $\mu$ g/ml LL-37 inkubiert. a) IL-12p70 wurde in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen. Zur Kontrolle wurden Überstände von mit Flagellin +/- LL-37 inkubierten DZ mitgeführt. b) Die Expression von CD83 und HLA-DR wurde mittels FACS analysiert. Die grau gefüllte Fläche gibt die unspezifische Färbung durch die Isotypkontrolle an; die dick schwarz umrandete Fläche stellt die Fluoreszenz der mit Antikörper markierten Zellen dar.

Auch die Stimulation mit dem Zytokinmix führte zu einer Aktivierung der DZ. Dies zeigte sich in einer leicht erhöhten Abgabe von IL-12p70 und einer deutlich verstärkten Expression der Oberflächenmarker CD83 und HLA-DR (Abb. 28a und b). Weder die IL-12p70 Abgabe noch die Expression der Oberflächenmarker wurde durch gleichzeitige Inkubation mit 20

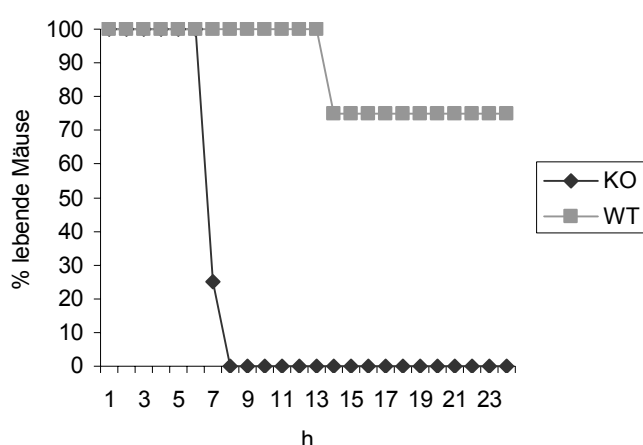
$\mu\text{g/ml}$  LL-37 verringert (Abb. 28 und b). Dies zeigt, dass LL-37 die Aktivierung von DZ nicht generell inhibiert, sondern dass DZ trotz Inkubation mit LL-37 prinzipiell noch aktivierbar sind und die in Kapitel 4.5.4 und 4.5.7 beobachteten Effekte von LL-37 auf die Aktivierung durch LPS, LTA und Flagellin spezifisch für die jeweiligen Aktivatoren sind.

#### 4.6 Effekt der LPS Bindung von CRAMP in vivo

Nachdem die Inhibierung der Zytokinabgabe von Immunzellen durch LL-37 und CRAMP in vitro gezeigt wurde, sollte ein Effekt der LPS Bindung durch CRAMP in vivo nachgewiesen werden. Hierzu wurde das Verhalten von CRAMP KO und WT Mäusen bei einer Sepsis untersucht. Es wurden zwei verschiedene Sepsismodelle angewandt: Erstens ein in der Literatur oft verwendetes LPS Sepsis Modell, bei dem die Mäuse durch Injektion von Galaktosamin besonders empfindlich auf LPS reagieren [125]. Zweitens ein Modell, bei dem eine hohe Infektionsdosis *E. coli* in der Lunge zu einer Sepsis führt.

##### 4.6.1 CRAMP KO Mäuse zeigen erhöhte Letalität in einem LPS Sepsismodell

WT und KO Mäusen wurde LPS zusammen mit Galaktosamin in die Bauchhöhle gespritzt und das Überleben der Mäuse für 24 Stunden beobachtet.

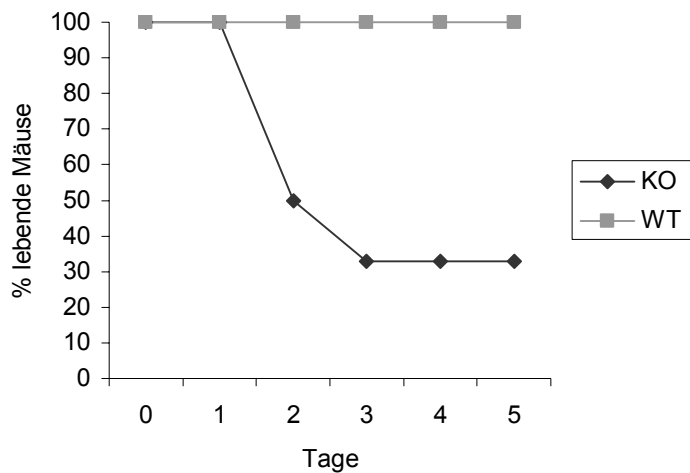


**Abb. 29: Die Letalität von KO Mäusen in einem LPS Sepsis Modell ist erhöht.** KO und WT Mäusen wurde 18 mg Galaktosamin und 100 ng LPS in die Bauchhöhlen gespritzt. Das Überleben der Mäuse wurde für 24 beobachtet (n = 4).

Es zeigte sich, dass alle KO Mäuse in einem relativ kleinen Zeitraum, sieben bis acht Stunden nach der LPS Gabe, starben (Abb. 29). Zu diesem Zeitpunkt lebten noch alle WT Mäuse. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 24 Stunden starb nur eine der WT Mäuse.

#### 4.6.2 CRAMP KO Mäuse zeigen erhöhte Letalität in einem bakteriellen Sepsismodell

In diesem Experiment wurden WT und KO Mäuse mit *E. coli* J96 intranasal infiziert und ihr Überleben über fünf Tage beobachtet.



**Abb. 30: Die Letalität von KO Mäusen in einem *E. coli* Sepsismodell ist erhöht.** KO und WT Mäuse wurden mit  $8 \times 10^6$  *E. coli* J96 intranasal infiziert und ihr Überleben für 5 Tage beobachtet (n=6).

Während alle WT Mäuse die verabreichte Dosis *E. coli* überlebten, starben vier der KO Mäuse (Abb. 30). Hier zeigte sich derselbe Effekt, der schon mit dem LPS Galaktosamin Modell beobachtet worden war: In beiden Modellen zeigten sich die KO Mäuse anfälliger für eine Sepsis, starben schneller und hatten eine erhöhte Sterberate.



## Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Funktion der humanen und murinen Cathelizidine, LL-37/hCAP18 und CRAMP, bei einer bakteriellen Infektion des Respirationstrakts näher untersucht. Überraschenderweise zeigte sich in einem Infektionsmodell mit mukoiden *P. aeruginosa*, dass CRAMP KO Mäuse die Bakterien schneller aus ihren Lungen klären konnten als WT Mäuse. Auch in anderen in dieser Arbeit verwendeten Infektionsmodellen war die antimikrobielle Aktivität von CRAMP für die Klärung der Infektion nicht von Bedeutung. Stattdessen nimmt CRAMP als Modulator der Immunantwort Einfluss auf den Verlauf der Infektion. Es wurde gezeigt, dass CRAMP und LL-37 die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems durch bakterielle Bestandteile hemmen. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal in vivo gezeigt, dass ein Cathelizidin bei einer Infektion als Immunmodulator wirkt.

### CRAMP wird bei bakterieller Infektion der Lunge vermehrt exprimiert

Aus der Analyse der BALF von Patienten mit Lungenerkrankungen weiß man, dass das humane Cathelizidin, LL-37/hCAP18, bei Infektionen des Respirationstrakts in erhöhten Konzentrationen in der Atemwegsflüssigkeit vorliegt [42,109]. Daher wird vermutet, dass LL-37 eine Funktion bei Infektionen des Respirationstrakts übernimmt. Direkt gezeigt werden konnte dies bisher jedoch noch nicht. In dieser Studie sollte deswegen in einem Mausmodell untersucht werden, ob und wie das murine Cathelizidin, CRAMP, an der Immunantwort auf eine bakterielle Infektion in der Lunge beteiligt ist, um auf diesem Wege Rückschlüsse für die Funktion von LL-37 beim Menschen zu erhalten.

Als erstes wurde die Expression von CRAMP im Respirationstrakt untersucht. In der BALF von gesunden Mäusen konnte CRAMP im Western Blot nicht nachgewiesen werden und liegt daher, wenn überhaupt, nur in sehr geringen Mengen vor. Auch die Expression von CRAMP auf RNA- und Proteinebene war in gesunden Tieren kaum nachweisbar. 24 Stunden nach einer intranasalen Infektion mit Bakterien wurden dagegen stark erhöhte Mengen an CRAMP in der BALF gefunden. Dabei wurde hauptsächlich die antimikrobiell inaktive Proform des Peptids detektiert. Das geschnittene CRAMP war nur in geringen Mengen nachweisbar. Dies deutet darauf hin, dass auch CRAMP als Propeptid abgegeben wird und erst außerhalb der

Zelle durch Proteasen geschnitten wird, so wie es für humanes LL-37/hCAP18 aus neutrophilen Granulozyten gezeigt wurde [41]. Eine Erklärung für die geringen Mengen an geschnittenem Peptid könnte sein, dass es aufgrund der hohen positiven Ladung hauptsächlich an negativ geladene Makromoleküle gebunden vorliegt [51,54] oder schnell abgebaut wird. Um die Quellen für die hohe Konzentration an abgegebenem CRAMP während einer Infektion zu finden, wurde die Expression von CRAMP im Respirationstrakt von infizierten Tieren durch RT-PCR und Immunhistochemie auf RNA- und Proteinebene untersucht. Die Immunhistochemie zeigte starke Expression von CRAMP in den eingewanderten neutrophilen Granulozyten, die wahrscheinlich die Hauptquelle des abgegebenen CRAMPs darstellen. Außerdem wurde CRAMP in den Lungen von infizierten Mäusen auch in Makrophagen und den Epithelzellen der großen Atemwege detektiert. Da die Epithelzellen von gesunden Mäusen in der Immunhistochemie keine Färbung zeigen, wird CRAMP in den Epithelzellen durch bakterielle Infektion induziert. Auch die erhöhten Mengen an CRAMP RNA in den Luftröhren von infizierten Mäusen könnten durch eine Induktion der Expression in Epithelzellen zustande kommen. Experimente mit einer murinen Lungenepithelzelllinie zeigten, dass sich die CRAMP Expression auch in vitro induzieren lässt. Sowohl in vitro als auch in vivo ließ sich die CRAMP Expression und Abgabe durch verschiedene gramnegative und grampositive Bakterien induzieren. Dies ist der erste in vivo und in vitro Beweis, dass ein Cathelizidin in Lungenepithelzellen durch Infektion induziert wird. Das humane LL-37/hCAP18 wird zwar in Atemwegsepithelzellen exprimiert, scheint in diesen jedoch weder in vitro noch in vivo induzierbar zu sein. Dagegen ist bekannt, dass LL-37/hCAP18 in Keratinozyten und Nasenepithelzellen und CRAMP in Makrophagen induzierbar sind [38,56,97].

Verschiedene in vitro Studien dieser und anderer Arbeiten zeigen, dass für die Funktionen der Cathelizidine Konzentrationen zwischen 50 ng/ml und 20 µg/ml benötigt werden. Die Konzentration der ungeschnittenen Form von CRAMP in der BALF von infizierten Tieren wird aufgrund des mit aufgetragenen, rekombinanten CRAMPs auf ca. 100 ng/ml geschätzt. Da es bei der Gewinnung der BALF zu einer starken Verdünnung des Atemwegssekrets kommt, kann davon ausgegangen werden, dass CRAMP in der Atemwegsflüssigkeit während einer bakteriellen Infektion in physiologisch relevanten Konzentrationen vorliegt.

## CRAMP wirkt in vitro antimikrobiell auf eine Vielzahl von Bakterien

Bei Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von chemisch synthetisiertem CRAMP in vitro zeigte sich, dass verschiedene Bakterien sehr unterschiedlich auf CRAMP reagieren. Wogegen die MİK für alle getesteten gramnegativen Bakterien in einem Bereich zwischen 2 und 15 µg/ml CRAMP lag, zeigten sich die beiden grampositiven Bakterien *S. pneumoniae* und *S. aureus* kaum empfindlich gegenüber CRAMP (MİK  $\geq$  100 µg/ml). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen antimikrobieller Assays anderer Gruppen, die sowohl für LL-37 als auch für CRAMP eine stärkere Aktivität gegenüber gramnegativen Bakterien zeigen [33,37,47]. Von *S. aureus* wurden auch zwei Mutanten, denen die Resistenzgene *mprF* oder *dltA* fehlen, auf ihre Empfindlichkeit gegenüber CRAMP getestet. Mit Hilfe von *mprF* können die Bakterien ihre Membran mit L-Lysin modifizieren, wodurch sie positiver geladen wird und kationische AMP nicht mehr so leicht binden können.  $\Delta dltA$  Mutanten haben veränderte Teichonsäure (ohne D-Alanin) in der Zellwand. Auch hierdurch ist die Oberfläche der Bakterien weniger stark negativ geladen. Beide Mutanten,  $\Delta dltA$  und  $\Delta mprF$ , sind für ihre erhöhte Sensitivität gegenüber den ebenfalls kationischen Defensinen bekannt [62,63]. Auch gegenüber CRAMP (MİK = 25 µg/ml) zeigten sich beide Mutanten deutlich empfindlicher als der Wildtyp Stamm (MİK > 50 µg/ml), waren jedoch trotzdem noch weniger empfindlich als die getesteten gramnegativen Bakterien. Um den Einfluss von bakteriellen Exopolysacchariden auf die antimikrobielle Wirkung von CRAMP zu testen, wurde ein mukoider *P. aeruginosa* Stamm in die Studie integriert. Der Stamm NH57388A ist ein klinisches Isolat aus einem Cystische Fibrose Patienten mit einem stabilen mukoiden Phänotyp [126]. Obwohl vermutet wurde, dass eine Schleimschicht die Bakterie vor antimikrobiellen Peptiden schützen kann, erwies sich dieser Stamm als der CRAMP sensitivste von allen getesteten Bakterien (MİK = 5 µg/ml). Zusätzlich wurde eine Mutante desselben Stamms (NH57388C), die kein Exopolysaccharid mehr herstellen kann, in diesem antimikrobiellen Assay getestet. Sie unterschied sich nicht vom Wildtyp. Zumindest bei diesem *P. aeruginosa* Stamm ist die Empfindlichkeit gegenüber CRAMP also nicht durch die Schleimschicht beeinflusst.

In welchen Konzentrationen Cathelizidine in vivo z. B. in der Schleimschicht von Epithelien vorliegen, ist schwierig zu bestimmen und von daher noch weitgehend unklar. Durch die Bestimmung der LL-37/hCAP18 Konzentration in BALF und Einbeziehung der Verdünnung des Atemwegssekrets durch die bronchoalveoläre Spülung wurde für LL-37/hCAP18 im Atemwegssekret eine ungefähre Konzentration von 1 – 5 µg/ml errechnet [109]. Bei Infektion

liegt die errechnete Konzentration noch höher [109]. Diese Konzentrationen würden ausreichen, um die empfindlicheren Bakterien zu töten. Wenn man davon ausgeht, dass die lokalen LL-37 Konzentrationen, z. B. in der Nähe von degranulierenden Neutrophilen, noch bedeutend höher sein könnten, sind die ermittelten MİK also durchaus ausreichend, um in vivo von Bedeutung zu sein. In welchen Konzentrationen Cathelizidine in vivo allerdings tatsächlich antimikrobiell wirken, ist jedoch bis heute vollkommen unklar. Da sowohl physiologische Salzkonzentrationen [48,49], als auch die Bindung an negativ geladene Makromoleküle [51,54] die antimikrobielle Aktivität inhibieren, ist nicht endgültig geklärt, ob Cathelizidine in vivo überhaupt antimikrobiell wirken. Auf der anderen Seite legt eine kürzlich veröffentlichte Studie nahe, dass in vivo Carbonate, die in Geweben vorhanden sind, Bakterien empfindlicher gegenüber kationischen antimikrobiellen Peptiden machen [50].

### **CRAMP wirkt in vivo bei einer Infektion des Respirationstrakts nicht antimikrobiell sondern als Immunmodulator**

Über die antimikrobielle Aktivität von CRAMP in der Lunge ist noch nichts bekannt. Es gibt allerdings einige Arbeiten, die die antimikrobielle Aktivität von CRAMP in vivo bei Infektionen in anderen Organen nachweisen. In einem Infektionsmodell der Haut mit Gruppe A Streptokokken wurde gezeigt, dass CRAMP KO Mäuse eine größere und langsamer abheilende Wunde bekommen als WT Mäuse [44]. Auch bei einer oralen Infektion mit dem Enteropathogen *Citrobacter rodentium* entwickelten CRAMP KO Mäuse eine stärkere Infektion im Darm, die über eine größere Fläche ausgebreitet war und zu stärkerer Epithelschädigung führte als bei WT Mäusen [58]. Schließlich konnte auch gezeigt werden, dass Makrophagen aus WT Mäusen, die mit dem intrazellulären Pathogen *Salmonella typhimurium* infiziert wurden, die Bakterien besser töten können als Makrophagen aus CRAMP KO Mäusen [56].

In dieser Arbeit sollte zunächst die antimikrobielle Aktivität von CRAMP bei Infektionen des Respirationstrakts untersucht werden. Dazu wurden CRAMP KO Mäuse intranasal mit Bakterien infiziert und die Anzahl der lebenden Bakterien nach 24 Stunden in ihren Lungen bestimmt und mit der Anzahl Bakterien in den Lungen von ebenfalls infizierten WT Mäusen verglichen. Dieses Experiment wurde mit verschiedenen Bakterien durchgeführt, es konnte jedoch nie ein Unterschied in der Bakterienzahl zwischen KO und WT Mäusen festgestellt werden. Dabei machte es keinen Unterschied ob gramnegative oder grampositive, CRAMP

sensitive oder CRAMP unempfindliche Bakterien verwendet wurden. Generell wurde beobachtet, dass sowohl die WT als auch die KO Mäuse sehr gut mit der Infektion umgehen konnten und nach 24 Stunden schon ein Großteil der Bakterien aus den Lungen geklärt war. Eine Beteiligung von CRAMP an der Klärung der Infektion konnte nicht nachgewiesen werden. Die antimikrobielle Aktivität von CRAMP ist entweder so weit redundant, dass sich ein Fehlen von CRAMP (unter den getesteten Bedingungen) nicht negativ auswirkt oder CRAMP übernimmt bei einer Lungeninfektion tatsächlich keine antimikrobielle Funktion. Diese These wird durch Daten einer anderen Gruppe unterstützt, die zeigen, dass die Gabe eines Derivats des Cathelizidins aus Hase (CAP18<sub>106-137</sub>), das in vitro antimikrobielle Aktivität besitzt, keinen Einfluss auf die Bakterienzahl in einem murinen Infektionsmodell der Lunge mit *P. aeruginosa* hat [131]. Die intratracheale Infektion mit einem Gemisch aus *P. aeruginosa* und CAP18<sub>106-137</sub> führte zu keiner verminderten Bakterienzahl in der Lunge. Stattdessen konnte aber eine verminderte Verletzung der Lunge und, zumindest bei zusätzlicher Gabe eines Antibiotikums, auch eine verminderte Zytokinproduktion beobachtet werden.

Die Bakterien, die zunächst für die Infektionsversuche verwendet wurden, konnten alle nach 24 Stunden fast vollständig aus den Lungen der Mäuse geklärt werden. Deswegen wurde als nächstes ein Bakterium verwendet, mit dem sich bei Mäusen eine chronische, über 1-2 Wochen andauernde Infektion in der Lunge erreichen lässt [126]. Dabei handelt es sich um ein *P. aeruginosa* Isolat aus der Lunge eines Cystische Fibrose Patienten, das einen stabilen mukoiden Phänotyp besitzt. Intranasale Infektion von CRAMP KO und WT Mäusen mit diesem *P. aeruginosa* Stamm führte zu einem überraschenden Ergebnis. Nach 24-stündiger Infektion hatten die KO Mäuse zehnmal mehr Bakterien aus den Lungen geklärt als die WT Mäuse. Dies zeigt erneut, dass CRAMP bei einer Lungeninfektion nicht direkt antimikrobiell wirkt, bzw. diese antimikrobielle Aktivität in den KO Mäusen komplett kompensiert wird. Die Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen war in den BALF der KO Tiere gegenüber den WT Tieren verringert. Es ist jedoch nicht klar, ob dies ein Effekt des fehlenden CRAMP ist oder eher ein sekundärer Effekt, der durch die schon weiter vorangeschrittene Klärung der Infektion und die dadurch verringerten bakteriellen Stimuli zu Stande gekommen ist. Um den Verlauf der Infektion weiter zu charakterisieren wurden KO und WT Tiere für nur 2 bzw. 4 Stunden infiziert. Hierbei zeigte sich, dass der Einstrom von neutrophilen Granulozyten in WT Tieren etwas verlangsamt gegenüber den KO Tieren ist. Dies könnte ein Grund für die verlangsamte Klärung der Bakterien bei WT Tieren sein. Um nach weiteren

Unterschieden zu suchen, wurden die BALF von WT und KO Tieren, die für 2 Stunden infiziert waren, mit einem Proteinarray auf die Anwesenheit von 48 Zytokinen untersucht. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Konzentration von MIP-1 $\gamma$ . KO Mäuse hatten nach zweistündiger Infektion schon hohe Level an MIP-1 $\gamma$  in der BALF, während bei WT Mäusen kaum MIP-1 $\gamma$  vorhanden war. MIP-1 $\gamma$  (CCL9) gehört zur Familie der CCL Chemokine und bindet an den CCR1 Rezeptor [132]. Weitere Mitglieder dieser Familie sind z.B. MIP-1 $\alpha$  (CCL3) und MIP-1 $\beta$  (CCL4), die von aktivierten Makrophagen produziert und abgegeben werden und Makrophagen und andere Immunzellen an den Entzündungsherd rekrutieren [132]. Über MIP-1 $\gamma$  ist wenig bekannt, außer, dass es von einer Reihe von Zelltypen, besonders von Makrophagen, DZ und einigen Epithelien produziert wird und chemotaktisch für T-Zellen und DZ ist [133-135]. Da wir einen Unterschied im Einstrom von neutrophilen Granulozyten zwischen KO und WT Tieren und einen sehr frühen Unterschied in der MIP-1 $\gamma$  Konzentration zwischen den Tieren beobachten konnten, postulieren wir, dass MIP-1 $\gamma$  auch für Neutrophile chemotaktisch ist. Dies muss jedoch in weiteren Studien durch einen Migrationsassay gezeigt werden. MIP-1 $\gamma$  ELISA mit Zellkulturüberständen zeigte, dass MIP-1 $\gamma$  vor allem von Makrophagen, aber auch von Epithelzellen produziert wird. Die MIP-1 $\gamma$  Produktion unterschied sich nicht zwischen Makrophagen, die aus WT und KO Tieren isoliert wurden. In Makrophagen und Epithelzellen wurde MIP-1 $\gamma$  Abgabe durch LPS induziert. Diese Induktion wurde durch gleichzeitige Zugabe von CRAMP unterdrückt. Die hohen Konzentrationen an MIP-1 $\gamma$  in den BALF von KO Tieren nach zwei Stunden Infektion stammen demnach vermutlich von Epithelzellen und residenten Makrophagen, deren MIP-1 $\gamma$  Abgabe durch die Infektion verstärkt war. Diese Verstärkung der MIP-1 $\gamma$  Produktion wird in WT Mäusen durch das Vorhandensein von CRAMP eventuell verhindert, was die geringe Konzentration in der BALF von WT Mäusen erklären könnte.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich Makrophagen und neutrophile Granulozyten aus WT und KO Tieren unterscheiden. Aus der Bauchhöhle isolierte neutrophile Granulozyten aus WT und KO Mäusen unterschieden sich weder in ihrer RSS Produktion noch in ihrer Zytokinabgabe nach LPS Stimulation. Auch Makrophagen von WT und KO Tieren unterschieden sich weder in ihrer basalen Zytokinabgabe noch in der durch LPS induzierten Zytokinabgabe. Da keine verminderte Fähigkeit der Immunzellen aus WT Mäusen, auf LPS zu reagieren und Zytokine zu produzieren, festgestellt werden konnte, wird postuliert, dass das Fehlen von CRAMP in den Immunzellen keine Auswirkung auf die Aktivität hat, sondern, dass das bei Infektionen in großen Mengen abgegebene CRAMP negativ auf die Aktivität von Immunzellen wirkt. In vivo konnte allerdings nur eine verminderte Abgabe von

MIP-1 $\gamma$ , nicht jedoch von proinflammatorischen Zytokinen gezeigt werden. Dass keine verminderten Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen in WT Tieren beobachtet werden konnte, könnte an der Überlagerung zweier Effekte liegen: Einerseits wird in WT Tieren die Abgabe durch die hohen CRAMP Konzentrationen gehemmt, andererseits ist jedoch durch die verlangsamte Klärung der Infektion ein stärkerer bakterieller Stimulus als in KO Tieren vorhanden. Weitere ex vivo Studien mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen aus CRAMP KO und WT Tieren müssen durchgeführt werden, um die schnellere Klärung der Infektion in KO Mäusen zu erklären. Besonders die antimikrobielle Aktivität von neutrophilen Granulozyten aus WT und KO Mäusen muss in weiteren Experimenten verglichen und ein eventueller Einfluss von externem CRAMP und MIP-1 $\gamma$  untersucht werden. Es wird postuliert, dass CRAMP nicht nur einen hemmenden Einfluss auf die Zytokinabgabe, sondern auch auf die antimikrobielle Aktivität von neutrophilen Granulozyten und/oder Makrophagen hat. Die verzögerte Klärung der Bakterien in den Lungen von WT Tieren könnte demnach auf den verzögerten Einstrom von neutrophilen Granulozyten und die verringerte Aktivität der eingeströmten Zellen zurückzuführen sein.

Die Immunreaktion ist jedoch ein so komplexer Vorgang, dass es auch denkbar ist, dass der beobachtete Phänotyp nicht an der veränderten Aktivität einzelner Immunzellen festzumachen ist. Interessant erscheinen in diesem Zusammenhang mehrere Arbeiten, in denen andere KO Mäuse in Lungeninfektionsmodellen mit *P. aeruginosa* untersucht wurden. Bemerkenswerterweise wurde beim Fehlen eines Zytokins häufig ein ähnlicher Phänotyp wie in dieser Arbeit beobachtet: So hatten IL-1 $\beta$  Rezeptor KO Mäuse [136], TNF- $\alpha$  Rezeptor KO Mäuse [137], IFN- $\gamma$  Rezeptor KO Mäuse [138] und IL-18 KO Mäuse [139] alle nach 24 Stunden Infektion mit *P. aeruginosa* weniger Bakterien in den Lungen als die WT Mäuse. Dies ist besonders erstaunlich, da es sich bei allen drei Rezeptoren um Rezeptoren für proinflammatorische Zytokine handelt, die man eher mit einer verbesserten Immunantwort in Verbindung bringen würde. Die schnellere Klärung der Infektion ging in diesen Studien teilweise mit einer verminderten Zytokinkonzentration in der BALF einher. Auch dies ist parallel zu den Daten der hier vorgestellten Arbeit. Allerdings wurde in keiner der erwähnten Studien die Aktivität von Immunzellen aus KO und WT Tieren verglichen und auch sonst keine ausreichende Erklärung für den beobachteten Phänotyp gefunden. Dies zeigt erneut, wie komplex die Immunreaktion ist, und wie das Fehlen eines einzelnen Mediators diese, in nicht immer gleich erklärbarer Weise, verändern kann.



## **LL-37 und CRAMP hemmen die Aktivierung von Immunzellen durch bakterielle Stimuli**

Im nächsten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von LL-37 und CRAMP auf die Aktivierung von Immunzellen durch verschiedene Stimuli untersucht. Als erstes wurde LPS für die Stimulation von Immunzellen verwendet. LPS als Bestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien ist ein potenter Aktivator von Immunzellen. Bei Aktivierung geben Immunzellen proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und TNF- $\alpha$  ab. Es wurde gezeigt, dass LL-37 und CRAMP die Aktivierung von Immunzellen durch LPS inhibieren. So wurde bei gleichzeitiger Inkubation mit LPS und LL-37 bzw. CRAMP die Zytokinabgabe konzentrationsabhängig gehemmt. Dabei wurde, je nach Zelltyp, ein Beginn der Hemmung bei einer Cathelizidinkonzentration zwischen 0,3 und 1  $\mu\text{g/ml}$  und eine vollständige Hemmung der Zytokinabgabe bei CRAMP / LL-37 Konzentrationen zwischen 5 und 20  $\mu\text{g/ml}$  beobachtet. Eine Hemmung der LPS induzierten Zytokinabgabe durch LL-37 / CRAMP wurde für humane und murine Makrophagenzelllinien, für aus der Bauchhöhle von Mäusen isolierte Makrophagen und neutrophile Granulozyten und für humane DZ gezeigt.

Die Inhibierung der Aktivierung von DZ wurde weitergehend untersucht. Es zeigte sich, dass auch die für Aktivierung und Reifung charakteristische erhöhte Expression der Oberflächenmarker HLA-DR und CD83 durch LL-37 verhindert wurde. Um eine unspezifische Wirkung von LL-37 auszuschließen, wurden dieselben Experimente auch mit einem Kontrollpeptid durchgeführt, das aus den gleichen Aminosäuren wie LL-37 in einer anderen Reihenfolge besteht. Dieses sLL-37 hatte in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g/ml}$  keinen Einfluss auf die durch LPS ausgelöste Erhöhung der Zytokinabgabe und Expression von Oberflächenmarkern. Eine unspezifische Wirkung der Aminosäurezusammensetzung, der Peptidladung oder durch die Synthese hervorgerufene Artefakte können daher ausgeschlossen werden. In einem weiteren Experiment wurde die Fähigkeit der DZ, T-Zellen zu aktivieren, untersucht. DZ aktivieren T-Zellen durch Präsentation von Antigenen und costimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche. Aktivierte T-Zellen zeichnen sich unter anderem durch die erhöhte Abgabe von IL-2 und IFN- $\gamma$  aus (Th1 Antwort) [4]. DZ, die durch LPS Inkubation aktiviert waren, regten kokultivierte naive T-Zellen zur IL-2 und IFN- $\gamma$  Sekretion an. Dagegen zeigten T-Zellen, die mit mit LPS und LL-37 vorinkubierten DZ kokultiviert wurden, keine gesteigerte Zytokinabgabe. Diese DZ waren nicht in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren. Die Ergebnisse zeigen, dass LL-37 die Aktivierung von DZ durch LPS vollständig verhindern kann. Da DZ an der Verknüpfung von angeborener und adaptiver Immunantwort beteiligt



sind, wirkt sich die Inhibierung der Aktivierung DZ durch LL-37 nicht nur auf das angeborene Immunsystem (z. B. verändertes Zytokinmilieu, verlangsamte Rekrutierung weiterer Immunzellen) sondern auch auf die Aktivierung der adaptiven Immunantwort aus. LL-37 könnte über die Inhibierung von DZ Einfluss auf die Regulation der adaptiven Immunantwort nehmen.

Die Arbeit einer anderen Gruppe zum Einfluss von LL-37 auf DZ kommt zu einem anderen Ergebnis. Davidson et al. zeigten, dass LL-37 die Reifung von DZ aus Monozyten verändert und zu stärker aktivierten DZ Zellen führt [76]. Die in Anwesenheit von LL-37 kultivierten unreifen DZ zeigten eine erhöhte phagozytotische Aktivität und, nach Aktivierung durch LPS, auch erhöhte Zytokinsekretion und Expression von costimulatorischen Molekülen sowie eine erhöhte Aktivierung von naiven T-Zellen. Diese Ergebnisse erscheinen zunächst widersprüchlich zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit. Allerdings muss man beachten, dass der Versuchsaufbau in beiden Studien sehr unterschiedlich war. Davidson et al. gaben sofort nach Isolation von Monozyten aus Blut LL-37 zusammen mit IL-4 und GM-CSF ins Kulturmedium. Die Monozyten wurden in Anwesenheit von LL-37 über sieben Tage zu unreifen DZ Zellen differenziert. Danach wurden sie mit LPS, aber ohne weitere Anwesenheit von LL-37, stimuliert. Die dadurch hervorgerufene Zytokinabgabe, Expression von costimulatorischen Molekülen und Fähigkeit zur T-Zell Aktivierung war bei den DZ, die unter Anwesenheit von LL-37 differenziert worden waren, leicht erhöht. Die Experimente in dieser Arbeit wurden jedoch mit unreifen DZ, die ohne LL-37 aus Monozyten differenziert wurden durchgeführt. Am siebten Tag nach der Monozytenisolation wurden die unreifen DZ durch LPS aktiviert und die gleichzeitige Gabe von LL-37 untersucht. Für die Qualität der Ergebnisse war es dabei nicht von Bedeutung ob LL-37 zusammen oder bis zu drei Stunden vor oder nach der LPS Gabe zu den Zellen gegeben wurde (Daten nicht gezeigt). Auch konnte kein Effekt durch alleinige Inkubation der unreifen DZ mit LL-37 beobachtet werden. Betrachtet man die Ergebnisse dieser und der anderen Arbeit im Zusammenhang, könnte man folgenden Schluss ziehen: Residente unreife DZ, die sich in Geweben befinden (repräsentiert durch das in dieser Arbeit vorliegende in vitro Modell) und ständig in Kontakt mit Antigenen, teilweise auch bakterieller Natur kommen, werden bei Anwesenheit von LL-37 nicht so schnell aktiviert. Dies könnte durchaus von Nutzen sein, da nicht bei einzelnen Bakterien, die leicht durch das angeborene Immunsystem bekämpft werden können, die Maschinerie der adaptiven Immunantwort aktiviert werden muss. Handelt es sich aber um eine stärkere Infektion, werden durch die am Infektionsherd ausgeschütteten Zytokine weitere Monozyten und Vorläufer DZ ins Gewebe rekrutiert (repräsentiert durch das in vitro Modell der Gruppe

um Davidson), die unter der Anwesenheit von hohen lokal vorliegenden LL-37 Konzentrationen zu besonders aktiven DZ heranreifen und so eine schnelle Aktivierung der adaptiven Immunantwort und Bekämpfung der Infektion einleiten könnten. Um zu überprüfen, ob diese Theorie stimmt, müsste allerdings eine Vergleichsstudie durchgeführt werden.

Weiter wurde untersucht, ob die immunmodulatorischen Funktionen auf LPS beschränkt sind, oder ob LL-37 auch die Aktivierung durch andere Stimuli beeinflusst. Als Stimuli wurden zunächst Liganden anderer TLR verwendet. Sowohl LTA als Ligand für TLR2 als auch der TLR5 Ligand Flagellin konnten DZ aktivieren und führten zu einer Erhöhung der Zytokinabgabe und der Expression der Oberflächenmarker HLA-DR und CD83. Durch Zugabe von 20 µg/ml LL-37 wurde diese Aktivierung vollständig gehemmt. Zytokinabgabe und Oberflächenexpression von HLA-DR und CD83 waren nicht anders als bei unreifen, nicht stimulierten DZ. Auch Poly I:C, als Ligand für TLR3, wurde zur Aktivierung der DZ verwendet, führte jedoch nur zu einer sehr geringen Zytokinabgabe der DZ. Diese wurde durch die gleichzeitige Inkubation mit LL-37 nicht beeinflusst. Als nächstes wurde ein Zytokinmix, bestehend aus IL-1β, IL-6 und TNF-α, zur Aktivierung der DZ verwendet. Dieser führte zu einer starken Aktivierung, gekennzeichnet durch die Abgabe von IL-12p70 und die hohe Expression der beiden Oberflächenmarker. Durch die Zugabe von 20 µg/ml LL-37 wurden weder die IL-12p70 Abgabe noch die Expression von HLA-DR und CD83 verändert.

Diese Ergebnisse zeigen, dass LL-37 nicht nur die Aktivierung DZ durch LPS, sondern auch durch die beiden TLR Liganden LTA und Flagellin hemmen kann. Die immunmodulatorische Funktion von LL-37 beschränkt sich demnach nicht auf Veränderung der Reaktion von Immunzellen auf LPS, sondern kann auf LTA und Flagellin ausgeweitet werden. Parallel zu dieser Arbeit wurden Ergebnisse einer anderen Gruppe veröffentlicht, die zeigen, dass LL-37 auch die Reaktion von Makrophagen auf LTA hemmen kann [89,95]. Es ist gut möglich, dass LL-37 auch die Reaktion von Immunzellen auf viele weitere TLR Liganden modifiziert. Dies wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und ist ein interessanter Ansatz für weitere Studien. Die Daten dieser Arbeit deuten allerdings darauf hin, dass LL-37 nicht die Aktivierung durch alle TLR hemmen kann, da die schwache Aktivierung DZ durch Poly I:C nicht gehemmt wurde. Auch dies müsste jedoch durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Zweifelsfrei ist jedoch, dass LL-37 nicht generell die Aktivierbarkeit von DZ hemmt. Dass LL-37 keinen Einfluss auf die Aktivierung DZ durch Zytokine hat, zeigt, dass erstens DZ auch in Anwesenheit von LL-37 prinzipiell noch aktivierbar sind, LL-37 also keinen generellen

Einfluss auf die Aktivierbarkeit oder Aktivität von DZ hat. Zweitens zeigt es, dass LL-37 selektiv die Aktivierung durch bestimmte Liganden hemmt.

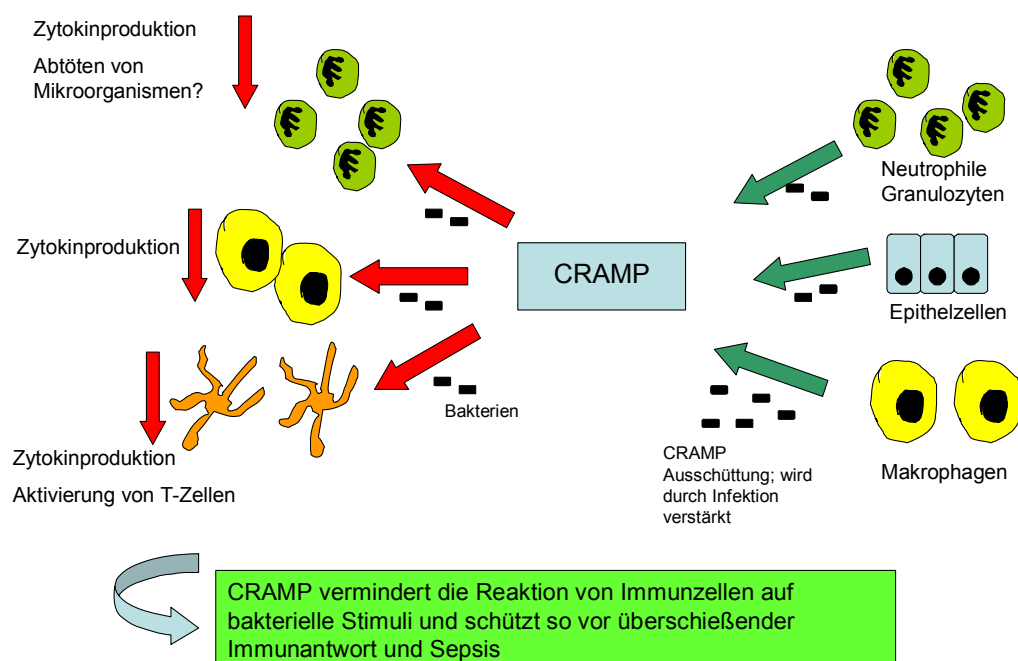
Um zu untersuchen, ob LL-37 seine Wirkung über Rezeptorbindung und anschließende intrazelluläre Signaltransduktion ausübt, wurden einige Inhibitoren für Signalwege, die mit LL-37 in Verbindung gebracht werden, auf ihren Einfluss auf die LL-37 Hemmung der LPS Aktivierung von DZ getestet. Keiner der getesteten Inhibitoren konnte die hemmende Wirkung von LL-37 auf LPS Aktivierung von DZ verringern oder gar verhindern. Eine Beteiligung der für LL-37 postulierten Signalwege über FPRL1 oder durch Transaktivierung des EGF Rezeptors wurde durch Verwendung eines Inhibitors für G-Protein gekoppelte Rezeptoren und eines MEK Inhibitors ausgeschlossen. Auch eine Beteiligung der durch Aktivierung von PI-3 Kinase oder Proteinase C ausgelösten Signalwege konnte durch Verwendung entsprechender Inhibitoren weitgehend ausgeschlossen werden. Demnach ist es wahrscheinlicher, dass LL-37 in die TLR Signalkaskade eingreift, als dass es seine Wirkung über einen getrennten Signalweg ausübt.

Der inhibitorische Effekt von LL-37 und CRAMP könnte auf eine reine Abbindung der Aktivatoren zurückzuführen sein. Schon lange ist bekannt, dass Cathelizidine LPS binden können [87,88]. Die LPS bindenden Eigenschaften von LL-37 wurden wiederholt untersucht, wobei sich zeigte, dass an LL-37 gebundenes LPS nicht mehr an seine Rezeptoren CD14 und TLR4 binden kann [92]. Es ist bekannt, dass LL-37 außer an LPS auch an weitere Moleküle, vor allem negativ geladene Makromoleküle wie DNA [51], Alginat [52] und Mucin [53] bindet. Da auch LTA und Flagellin negativ geladene Moleküle sind [140], könnte auch hier der Effekt von LL-37 durch ein Abbinden von LTA und Flagellin und damit Fernhalten von ihren Rezeptoren zustande kommen. Weiterhin ist es auch denkbar, dass LL-37 selber an TLR oder Corezeptoren bindet und so eine Bindung der eigentlichen Liganden verhindert, wie es schon für CD14 gezeigt wurde [93,94]. Da LL-37 die Zellmembran passieren und im Kern lokalisiert werden kann [74,75], ist es auch möglich, dass es Einfluss auf die Aktivität oder Bindung von Transkriptionsfaktoren hat. Da LL-37 jedoch selektiv nur die Aktivierung durch einige Liganden hemmt, scheint ein Eingreifen von LL-37 zu Beginn der Transkriptionskaskade wahrscheinlicher. Es müssen jedoch weitere Studien durchgeführt werden, um zu klären, wie LL-37 die Aktivierung von DZ durch LPS, LTA und Flagellin hemmt.

## **CRAMP beeinflusst den Verlauf einer Sepsis in vivo**

Hauptziel der Immunmodulation durch LL-37 und CRAMP könnte es sein, ein Überschießen der Immunantwort auf einen bakteriellen Reiz hin zu verhindern und dadurch den Organismus vor einer verhängnisvollen Sepsis zu schützen. Sollten die in vitro beobachteten Wirkungen von Cathelizidinen in vivo von Bedeutung sein, müsste das Abbinden von LPS durch CRAMP und die dadurch verminderte Aktivierung und Zytokinausschüttung von Immunzellen zum Schutz vor Sepsis beitragen. CRAMP KO Mäuse müssten deswegen anfälliger für eine Sepsis sein als WT Mäuse. Dies wurde in zwei verschiedenen Sepsismodellen überprüft. Zunächst wurde ein Sepsismodell verwendet bei dem die Mäuse durch Galaktosamin besonders empfindlich auf LPS reagieren [125]. In diesem Modell reichen geringe Mengen LPS, um zum Tod zu führen. Außerdem lassen sich Unterschiede in der Reaktion verschiedener Mäuse auf LPS leicht erkennen. Es zeigte sich, dass CRAMP KO Mäuse eine deutlich höhere Letalität hatten als WT Mäuse. Diese Daten sind im Einklang mit Ergebnissen zu LL-37 und Sepsis: Scott et al. zeigten, dass die Letalität von Galaktosamin sensibilisierten Mäusen durch kurz nach der LPS Gabe i. p. verabreichtem LL-37 herabgesetzt werden kann [89]. Bals et al. zeigten, dass die Letalität auch durch Überexpression von LL-37 durch viralen Gentransfer vermindert wird [91].

In einem weiteren Sepsisversuch wurden CRAMP KO und WT Mäuse mit einer hohen Dosis *E. coli* intranasal infiziert. In diesem Modell wird die Sepsis durch eine hohe Dosis an lebenden Bakterien im Respirationstrakt herbeigeführt, wobei LPS wahrscheinlich ein Hauptstimulus ist. Allerdings können auch andere Bestandteile von *E. coli* zur überschießenden Immunantwort beitragen. Auch hierbei zeigte sich bei den KO Mäusen eine erhöhte Letalität. In beiden Modellen ist die höhere Überlebensrate der WT Mäuse vermutlich auf ein Abbinden von LPS durch CRAMP, verminderte Bindung von LPS an seine Rezeptoren und eine dadurch verminderte Zytokinabgabe und Entzündung zurückzuführen.



**Abb. 30: CRAMP als Immunmodulator bei einer Infektion:** CRAMP wird im Respirationstrakt von neutrophilen Granulozyten, Epithelzellen und Makrophagen gebildet und ausgeschüttet. Die CRAMP Produktion wird durch Infektion verstärkt. Abgegebenes CRAMP inhibiert die Aktivierung von Immunzellen auf bakterielle Stimuli. Die Zytokinabgabe von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und DZ wird vermindert. Eventuell werden Immunzellen auch in ihrer Fähigkeit, phagozytierte Mikroorganismen zu töten, inhibiert. Der Körper wird auf diese Weise vor einer überschießenden Immunreaktion und Sepsis geschützt. Unter bestimmten Umständen macht sich eine verlangsamte Klärung der Infektion bemerkbar.

## Schlussbemerkung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die humanen und murinen AMP, LL-37 und CRAMP, in vielfacher Weise an der Modulation der Immunantwort beteiligt sind. Neben der antimikrobiellen Funktion, wie sie z. B. für CRAMP bei einem Infektionsmodell der Haut in vivo beschrieben ist [44], sind Cathelizidine auch komplexe Mediatoren der Immunantwort. Bisher wurde schon eine Beteiligung von Cathelizidinen an Wundheilung [77], Angiogenese [80] und Tumorwachstum [83] gezeigt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die antimikrobielle Funktion der Peptide bei einer bakteriellen Infektion des unteren Respirationstrakts nicht im Vordergrund steht. Eine größere Bedeutung kommt der immunmodulatorischen Funktion zu. Damit wurde gezeigt, dass Cathelizidine auch bei einer Infektion als Immunmodulatoren wirken können.

## Literaturverzeichnis

1. D.Yang, A.Biragyn, L.W.Kwak, J.J.Oppenheim (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol.* **23**, 291-296.
2. R.Bals, J.M.Wilson (2003). Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol.Life Sci.* **60**, 711-720.
3. C.Beisswenger, R.Bals (2005). Functions of antimicrobial peptides in host defense and immunity. *Curr.Protein Pept.Sci.* **6**, 255-264.
4. J.L.Curtis (2005). Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. *Proc.Am.Thorac.Soc.* **2**, 412-416.
5. R.Bals (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir.Res.* **1**, 141-150.
6. E.R.Lillehoj, K.C.Kim (2002). Airway mucus: its components and function. *Arch.Pharm.Res.* **25**, 770-780.
7. C.D.Bingle, C.J.Craven (2002). PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum.Mol.Genet.* **11**, 937-943.
8. J.Jacquot, A.Hayem, C.Galabert (1992). Functions of proteins and lipids in airway secretions. *Eur.Respir.J.* **5**, 343-358.
9. C.Beisswenger, R.Bals (2005). Antimicrobial peptides in lung inflammation. *Chem.Immunol.Allergy* **86**, 55-71.
10. A.W.Segal (2005). How neutrophils kill microbes. *Annu.Rev.Immunol.* **23**, 197-223.
11. V.Brinkmann, U.Reichard, C.Goosmann, B.Fauler, Y.Uhlemann, D.S.Weiss, Y.Weinrauch, A.Zychlinsky (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* **303**, 1532-1535.
12. N.Fujiwara, K.Kobayashi (2005). Macrophages in inflammation. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* **4**, 281-286.
13. M.Jin, J.M.Opalek, C.B.Marsh, H.M.Wu (2004). Proteome comparison of alveolar macrophages with monocytes reveals distinct protein characteristics. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **31**, 322-329.
14. P.G.Holt (2005). Pulmonary dendritic cells in local immunity to inert and pathogenic antigens in the respiratory tract. *Proc.Am.Thorac.Soc.* **2**, 116-120.
15. M.Sundquist, C.Johansson, M.J.Wick (2003). Dendritic cells as inducers of antimicrobial immunity in vivo. *APMIS* **111**, 715-724.

16. A.Iwasaki, R.Medzhitov (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* **5**, 987-995.
17. B.Lemaitre, E.Nicolas, L.Michaut, J.M.Reichhart, J.A.Hoffmann (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973-983.
18. Q.Sha, A.Q.Truong-Tran, J.R.Plitt, L.A.Beck, R.P.Schleimer (2004). Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **31**, 358-364.
19. S.Akira, S.Uematsu, O.Takeuchi (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**, 783-801.
20. M.Wu, E.Maier, R.Benz, R.E.Hancock (1999). Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **38**, 7235-7242.
21. W.T.Heller, A.J.Waring, R.I.Lehrer, T.A.Harroun, T.M.Weiss, L.Yang, H.W.Huang (2000). Membrane thinning effect of the beta-sheet antimicrobial protegrin. *Biochemistry* **39**, 139-145.
22. T.Ganz, M.E.Selsted, D.Szklarek, S.S.Harwig, K.Daher, D.F.Bainton, R.I.Lehrer (1985). Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin.Invest* **76**, 1427-1435.
23. J.Wehkamp, B.Schwind, K.R.Herrlinger, S.Baxmann, K.Schmidt, M.Duchrow, C.Wohlschlager, A.C.Feller, E.F.Stange, K.Fellermann (2002). Innate immunity and colonic inflammation: enhanced expression of epithelial alpha-defensins. *Dig.Dis.Sci.* **47**, 1349-1355.
24. R.J.Haynes, P.J.Tighe, H.S.Dua (1999). Antimicrobial defensin peptides of the human ocular surface. *Br.J.Ophthalmol.* **83**, 737-741.
25. P.B.McCray, Jr., L.Bentley (1997). Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **16**, 343-349.
26. R.Bals, X.Wang, Z.Wu, T.Freeman, V.Bafna, M.Zasloff, J.M.Wilson (1998). Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J.Clin.Invest* **102**, 874-880.
27. J.Harder, J.Bartels, E.Christophers, J.M.Schroder (2001). Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J.Biol.Chem.* **276**, 5707-5713.
28. J.R.Garcia, A.Krause, S.Schulz, F.J.Rodriguez-Jimenez, E.Kluver, K.Adermann, U.Forssmann, A.Frimpong-Boateng, R.Bals, W.G.Forssmann (2001). Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J.* **15**, 1819-1821.
29. Y.Q.Tang, J.Yuan, G.Osapay, K.Osapay, D.Tran, C.J.Miller, A.J.Ouellette, M.E.Selsted (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* **286**, 498-502.



30. M.Zaiou, V.Nizet, R.L.Gallo (2003). Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J.Invest Dermatol.* **120**, 810-816.
31. B.Agerberth, H.Gunne, J.Odeberg, P.Kogner, H.G.Boman, G.H.Gudmundsson (1995). FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 195-199.
32. J.B.Cowland, A.H.Johnsen, N.Borregaard (1995). hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett.* **368**, 173-176.
33. R.L.Gallo, K.J.Kim, M.Bernfield, C.A.Kozak, M.Zanetti, L.Merluzzi, R.Gennaro (1997). Identification of CRAMP, a cathelin-related antimicrobial peptide expressed in the embryonic and adult mouse. *J.Biol.Chem.* **272**, 13088-13093.
34. B.Agerberth, J.Charo, J.Werr, B.Olsson, F.Idali, L.Lindbom, R.Kiessling, H.Jornvall, H.Wigzell, G.H.Gudmundsson (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* **96**, 3086-3093.
35. K.Hase, L.Eckmann, J.D.Leopard, N.Varki, M.F.Kagnoff (2002). Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect.Immun.* **70**, 953-963.
36. K.Hase, M.Murakami, M.Iimura, S.P.Cole, Y.Horibe, T.Ohtake, M.Obonyo, R.L.Gallo, L.Eckmann, M.F.Kagnoff (2003). Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* **125**, 1613-1625.
37. R.Bals, X.Wang, M.Zasloff, J.M.Wilson (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 9541-9546.
38. M.Frohm, B.Agerberth, G.Ahangari, M.Stahle-Backdahl, S.Liden, H.Wigzell, G.H.Gudmundsson (1997). The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J.Biol.Chem.* **272**, 15258-15263.
39. J.Malm, O.Sorensen, T.Persson, M.Frohm-Nilsson, B.Johansson, A.Bjartell, H.Lilja, M.Stahle-Backdahl, N.Borregaard, A.Egesten (2000). The human cationic antimicrobial protein (hCAP-18) is expressed in the epithelium of human epididymis, is present in seminal plasma at high concentrations, and is attached to spermatozoa. *Infect.Immun.* **68**, 4297-4302.
40. N.M.Frohm, B.Sandstedt, O.Sorensen, G.Weber, N.Borregaard, M.Stahle-Backdahl (1999). The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect.Immun.* **67**, 2561-2566.
41. O.E.Sorensen, P.Follin, A.H.Johnsen, J.Calafat, G.S.Tjabringa, P.S.Hiemstra, N.Borregaard (2001). Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**, 3951-3959.



42. B.Agerberth, J.Grunewald, E.Castanos-Velez, B.Olsson, H.Jornvall, H.Wigzell, A.Eklund, G.H.Gudmundsson (1999). Antibacterial components in bronchoalveolar lavage fluid from healthy individuals and sarcoidosis patients. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **160**, 283-290.
43. K.Yu, K.Park, S.W.Kang, S.Y.Shin, K.S.Hahm, Y.Kim (2002). Solution structure of a cathelicidin-derived antimicrobial peptide, CRAMP as determined by NMR spectroscopy. *J.Pept.Res.* **60**, 1-9.
44. V.Nizet, T.Ohtake, X.Lauth, J.Trowbridge, J.Rudisill, R.A.Dorschner, V.Pestonjamas, J.Piraino, K.Huttner, R.L.Gallo (2001). Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**, 454-457.
45. Y.J.Gordon, L.C.Huang, E.G.Romanowski, K.A.Yates, R.J.Proske, A.M.McDermott (2005). Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr.Eye Res.* **30**, 385-394.
46. B.Lopez-Garcia, P.H.Lee, K.Yamasaki, R.L.Gallo (2005). Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection. *J.Invest Dermatol.* **125**, 108-115.
47. S.M.Travis, N.N.Anderson, W.R.Forsyth, C.Espiritu, B.D.Conway, E.P.Greenberg, P.B.McCray, Jr., R.I.Lehrer, M.J.Welsh, B.F.Tack (2000). Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect.Immun.* **68**, 2748-2755.
48. J.Turner, Y.Cho, N.N.Dinh, A.J.Waring, R.I.Lehrer (1998). Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**, 2206-2214.
49. D.M.Bowdish, D.J.Davidson, Y.E.Lau, K.Lee, M.G.Scott, R.E.Hancock (2005). Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J.Leukoc.Biol.* **77**, 451-459.
50. R.A.Dorschner, B.Lopez-Garcia, A.Peschel, D.Kraus, K.Morikawa, V.Nizet, R.L.Gallo (2006). The mammalian ionic environment dictates microbial susceptibility to antimicrobial defense peptides. *FASEB J.* **20**, 35-42.
51. D.J.Weiner, R.Bucki, P.A.Janmey (2003). The antimicrobial activity of the cathelicidin LL37 is inhibited by F-actin bundles and restored by gelsolin. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **28**, 738-745.
52. Y.Herasimenka, M.Benincasa, M.Mattiuzzo, P.Cescutti, R.Gennaro, R.Rizzo (2005). Interaction of antimicrobial peptides with bacterial polysaccharides from lung pathogens. *Peptides* **26**, 1127-1132.
53. K.B.C.G.M.G.T.B.G.B.R.Felgentreff. Mucosal antimicrobial peptides interact with airway mucus. submitted . 2006.  
Ref Type: Journal (Full)
54. W.Baranska-Rybak, A.Sonesson, R.Nowicki, A.Schmidtchen (2006). Glycosaminoglycans inhibit the antibacterial activity of LL-37 in biological fluids. *J.Antimicrob.Chemother.* **57**, 260-265.

55. O.E.Sorensen, L.Gram, A.H.Johnsen, E.Andersson, S.Bangsboll, G.S.Tjabringa, P.S.Hiemstra, J.Malm, A.Egesten, N.Borregaard (2003). Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin: a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina. *J.Biol.Chem.* **278**, 28540-28546.
56. C.M.Rosenberger, R.L.Gallo, B.B.Finlay (2004). Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular Salmonella replication. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 2422-2427.
57. N.A.Di, A.Vitiello, R.L.Gallo (2003). Cutting edge: mast cell antimicrobial activity is mediated by expression of cathelicidin antimicrobial peptide. *J.Immunol.* **170**, 2274-2278.
58. M.Iimura, R.L.Gallo, K.Hase, Y.Miyamoto, L.Eckmann, M.F.Kagnoff (2005). Cathelicidin mediates innate intestinal defense against colonization with epithelial adherent bacterial pathogens. *J.Immunol.* **174**, 4901-4907.
59. R.Bals, D.J.Weiner, R.L.Meegalla, J.M.Wilson (1999). Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J.Clin.Invest* **103**, 1113-1117.
60. E.S.Lysenko, J.Gould, R.Bals, J.M.Wilson, J.N.Weiser (2000). Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect.Immun.* **68**, 1664-1671.
61. R.K.Ernst, E.C.Yi, L.Guo, K.B.Lim, J.L.Burns, M.Hackett, S.I.Miller (1999). Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* **286**, 1561-1565.
62. A.Peschel, R.W.Jack, M.Otto, L.V.Collins, P.Staubitz, G.Nicholson, H.Kalbacher, W.F.Nieuwenhuizen, G.Jung, A.Tarkowski, K.P.van Kessel, J.A.van Strijp (2001). *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J.Exp.Med.* **193**, 1067-1076.
63. A.Peschel, M.Otto, R.W.Jack, H.Kalbacher, G.Jung, F.Gotz (1999). Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J.Biol.Chem.* **274**, 8405-8410.
64. T.Jin, M.Bokarewa, T.Foster, J.Mitchell, J.Higgins, A.Tarkowski (2004). *Staphylococcus aureus* resists human defensins by production of staphylokinase, a novel bacterial evasion mechanism. *J.Immunol.* **172**, 1169-1176.
65. R.Gennaro, M.Zanetti (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 31-49.
66. A.Risso, M.Zanetti, R.Gennaro (1998). Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. *Cell Immunol.* **189**, 107-115.
67. Z.Oren, J.C.Lerman, G.H.Gudmundsson, B.Agerberth, Y.Shai (1999). Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem.J.* **341** ( Pt 3), 501-513.

68. J.Johansson, G.H.Gudmundsson, M.E.Rottenberg, K.D.Berndt, B.Agerberth (1998). Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J.Biol.Chem.* **273**, 3718-3724.
69. J.Aarbiou, M.Ertmann, W.S.van, N.P.van, D.Rook, K.F.Rabe, S.V.Litvinov, J.H.van Krieken, W.I.de Boer, P.S.Hiemstra (2002). Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J.Leukoc.Biol.* **72**, 167-174.
70. Y.De, Q.Chen, A.P.Schmidt, G.M.Anderson, J.M.Wang, J.Wooters, J.J.Oppenheim, O.Chertov (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J.Exp.Med.* **192**, 1069-1074.
71. K.Kurosaka, Q.Chen, F.Yarovinsky, J.J.Oppenheim, D.Yang (2005). Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. *J.Immunol.* **174**, 6257-6265.
72. A.Elssner, M.Duncan, M.Gavrilin, M.D.Wewers (2004). A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J.Immunol.* **172**, 4987-4994.
73. D.M.Bowdish, D.J.Davidson, D.P.Speert, R.E.Hancock (2004). The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J.Immunol.* **172**, 3758-3765.
74. S.Sandgren, A.Wittrup, F.Cheng, M.Jonsson, E.Eklund, S.Busch, M.Belting (2004). The human antimicrobial peptide LL-37 transfers extracellular DNA plasmid to the nuclear compartment of mammalian cells via lipid rafts and proteoglycan-dependent endocytosis. *J.Biol.Chem.* **279**, 17951-17956.
75. Y.E.Lau, A.Rozek, M.G.Scott, D.L.Goosney, D.J.Davidson, R.E.Hancock (2005). Interaction and cellular localization of the human host defense peptide LL-37 with lung epithelial cells. *Infect.Immun.* **73**, 583-591.
76. D.J.Davidson, A.J.Currie, G.S.Reid, D.M.Bowdish, K.L.MacDonald, R.C.Ma, R.E.Hancock, D.P.Speert (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J.Immunol.* **172**, 1146-1156.
77. J.D.Heilborn, M.F.Nilsson, G.Kratz, G.Weber, O.Sorensen, N.Borregaard, M.Stahle-Backdahl (2003). The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J.Invest Dermatol.* **120**, 379-389.
78. S.Tokumaru, K.Sayama, Y.Shirakata, H.Komatsuzawa, K.Ouhara, Y.Hanakawa, Y.Yahata, X.Dai, M.Tohyama, H.Nagai, L.Yang, S.Higashiyama, A.Yoshimura, M.Sugai, K.Hashimoto (2005). Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide LL-37. *J.Immunol.* **175**, 4662-4668.

79. R.Shaykhiev, C.Beisswenger, K.Kandler, J.Senske, A.Puchner, T.Damm, J.Behr, R.Bals (2005). Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **289**, L842-L848.
80. R.Koczulla, D.G.von, C.Kupatt, F.Krotz, S.Zahler, T.Gloe, K.Issbrucker, P.Unterberger, M.Zaiou, C.Lebherz, A.Karl, P.Raake, A.Pfossier, P.Boekstegers, U.Welsch, P.S.Hiemstra, C.Vogelmeier, R.L.Gallo, M.Clauss, R.Bals (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J.Clin.Invest* **111**, 1665-1672.
81. Y.E.Lau, D.M.Bowdish, C.C.Cosseau, R.E.Hancock, D.J.Davidson (2005). Apoptosis of Airway Epithelial Cells: Human Serum Sensitive Induction by the Cathelicidin LL-37. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*
82. I.Nagaoka, H.Tamura, M.Hirata (2006). An Antimicrobial Cathelicidin Peptide, Human CAP18/LL-37, Suppresses Neutrophil Apoptosis via the Activation of Formyl-Peptide Receptor-Like 1 and P2X7. *J.Immunol.* **176**, 3044-3052.
83. J.D.Heilborn, M.F.Nilsson, C.I.Jimenez, B.Sandstedt, N.Borregaard, E.Tham, O.E.Sorensen, G.Weber, M.Stahle (2005). Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *Int.J.Cancer* **114**, 713-719.
84. Y.H.Yang, G.G.Zheng, G.Li, B.Zhang, Y.H.Song, K.F.Wu (2003). Expression of LL-37/hCAP-18 gene in human leukemia cells. *Leuk.Res.* **27**, 947-950.
85. L.L.An, X.T.Ma, Y.H.Yang, Y.M.Lin, Y.H.Song, K.F.Wu (2005). Marked reduction of LL-37/hCAP-18, an antimicrobial peptide, in patients with acute myeloid leukemia. *Int.J.Hematol.* **81**, 45-47.
86. K.Okumura, A.Itoh, E.Isogai, K.Hirose, Y.Hosokawa, Y.Abiko, T.Shibata, M.Hirata, H.Isogai (2004). C-terminal domain of human CAP18 antimicrobial peptide induces apoptosis in oral squamous cell carcinoma SAS-H1 cells. *Cancer Lett.* **212**, 185-194.
87. M.Hirata, Y.Shimomura, M.Yoshida, J.G.Morgan, I.Palings, D.Wilson, M.H.Yen, S.C.Wright, J.W.Larrick (1994). Characterization of a rabbit cationic protein (CAP18) with lipopolysaccharide-inhibitory activity. *Infect.Immun.* **62**, 1421-1426.
88. J.W.Larrick, M.Hirata, R.F.Balint, J.Lee, J.Zhong, S.C.Wright (1995). Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect.Immun.* **63**, 1291-1297.
89. M.G.Scott, D.J.Davidson, M.R.Gold, D.Bowdish, R.E.Hancock (2002). The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J.Immunol.* **169**, 3883-3891.
90. T.Kirikae, M.Hirata, H.Yamasu, F.Kirikae, H.Tamura, F.Kayama, K.Nakatsuka, T.Yokochi, M.Nakano (1998). Protective effects of a human 18-kilodalton cationic antimicrobial protein (CAP18)-derived peptide against murine endotoxemia. *Infect.Immun.* **66**, 1861-1868.

91. R.Bals, D.J.Weiner, A.D.Moscioni, R.L.Meegalla, J.M.Wilson (1999). Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect.Immun.* **67**, 6084-6089.
92. Y.Rosenfeld, N.Papo, Y.Shai (2006). Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. *J.Biol.Chem.* **281**, 1636-1643.
93. I.Nagaoka, S.Hirota, F.Niyonsaba, M.Hirata, Y.Adachi, H.Tamura, D.Heumann (2001). Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells. *J.Immunol.* **167**, 3329-3338.
94. I.Nagaoka, S.Hirota, F.Niyonsaba, M.Hirata, Y.Adachi, H.Tamura, S.Tanaka, D.Heumann (2002). Augmentation of the lipopolysaccharide-neutralizing activities of human cathelicidin CAP18/LL-37-derived antimicrobial peptides by replacement with hydrophobic and cationic amino acid residues. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **9**, 972-982.
95. N.Mookherjee, K.L.Brown, D.M.Bowdish, S.Doria, R.Falsafi, K.Hokamp, F.M.Roche, R.Mu, G.H.Doho, J.Pistollic, J.P.Powers, J.Bryan, F.S.Brinkman, R.E.Hancock (2006). Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J.Immunol.* **176**, 2455-2464.
96. S.M.Zughaier, W.M.Shafer, D.S.Stephens (2005). Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. *Cell Microbiol.* **7**, 1251-1262.
97. M.J.Nell, T.G.Sandra, M.J.Vonk, P.S.Hiemstra, J.J.Grote (2004). Bacterial products increase expression of the human cathelicidin hCAP-18/LL-37 in cultured human sinus epithelial cells. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **42**, 225-231.
98. P.Y.Ong, T.Ohtake, C.Brandt, I.Strickland, M.Boguniewicz, T.Ganz, R.L.Gallo, D.Y.Leung (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N.Engl.J.Med.* **347**, 1151-1160.
99. C.Beisswenger, K.Kandler, C.Hess, H.Garn, K.Felgentreff, M.Wegmann, H.Renz, R.Bals. Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense. *J.Immunol.* in press. 2006.  
Ref Type: Journal (Full)
100. M.D.Howell, R.L.Gallo, M.Boguniewicz, J.F.Jones, C.Wong, J.E.Streib, D.Y.Leung (2006). Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity.* **24**, 341-348.
101. D.Islam, L.Bandholtz, J.Nilsson, H.Wigzell, B.Christensson, B.Agerberth, G.Gudmundsson (2001). Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat.Med.* **7**, 180-185.
102. C.A.Sinaniotis (2004). Viral pneumoniae in children: incidence and aetiology. *Paediatr.Respir.Rev.* **5 Suppl A**, S197-S200.

103. T.M.File (2000). The epidemiology of respiratory tract infections. *Semin.Respir.Infect.* **15**, 184-194.
104. A.Kadioglu, P.W.Andrew (2004). The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends Immunol.* **25**, 143-149.
105. R.Malley, P.Henneke, S.C.Morse, M.J.Cieslewicz, M.Lipsitch, C.M.Thompson, E.Kurt-Jones, J.C.Paton, M.R.Wessels, D.T.Golenbock (2003). Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *PNAS* **100**, 1966-1971.
106. C.W.Wieland, S.Florquin, N.A.Maris, K.Hoebe, B.Beutler, K.Takeda, S.Akira, T.van der Poll (2005). The MyD88-Dependent, but Not the MyD88-Independent, Pathway of TLR4 Signaling Is Important in Clearing Nontypeable Haemophilus influenzae from the Mouse Lung. *J Immunol* **175**, 6042-6049.
107. A.M.LeVine, M.D.Bruno, K.M.Huelsman, G.F.Ross, J.A.Whitsett, T.R.Korfhagen (1997). Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* **158**, 4336-4340.
108. T.Hiratsuka, M.Nakazato, Y.Date, J.Ashitani, T.Minematsu, N.Chino, S.Matsukura (1998). Identification of human beta-defensin-2 in respiratory tract and plasma and its increase in bacterial pneumonia. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **249**, 943-947.
109. S.Schaller-Bals, A.Schulze, R.Bals (2002). Increased levels of antimicrobial peptides in tracheal aspirates of newborn infants during infection. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **165**, 992-995.
110. M.B.White, J.Amos, J.M.Hsu, B.Gerrard, P.Finn, M.Dean (1990). A frame-shift mutation in the cystic fibrosis gene. *Nature* **344**, 665-667.
111. J.F.Chmiel, P.B.Davis (2003). State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir.Res.* **4**, 8.
112. D.Katznelson (2006). On the complexity of the pulmonary microbiology in cystic fibrosis: thoughts of a clinician. *Isr.Med.Assoc.J.* **8**, 49-52.
113. J.W.Costerton, P.S.Stewart, E.P.Greenberg (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**, 1318-1322.
114. R.Soferman (2006). Immunopathophysiologic mechanisms of cystic fibrosis lung disease. *Isr.Med.Assoc.J.* **8**, 44-48.
115. J.M.Courtney, M.Ennis, J.S.Elborn (2004). Cytokines and inflammatory mediators in cystic fibrosis. *J.Cyst.Fibros.* **3**, 223-231.
116. R.Bals, D.J.Weiner, J.M.Wilson (1999). The innate immune system in cystic fibrosis lung disease. *J.Clin.Invest.* **103**, 303-307.
117. T.J.Moraes, J.H.Zurawska, G.P.Downey (2006). Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr.Opin.Hematol.* **13**, 21-27.



118. P.K.Singh, H.P.Jia, K.Wiles, J.Hesselberth, L.Liu, B.A.Conway, E.P.Greenberg, E.V.Valore, M.J.Welsh, T.Ganz, B.F.Tack, P.B.McCray, Jr. (1998). Production of beta -defensins by human airway epithelia. *PNAS* **95**, 14961-14966.
119. L.B.Soong, T.Ganz, A.Ellison, G.H.Caughey (1997). Purification and characterization of defensins from cystic fibrosis sputum. *Inflamm.Res.* **46**, 98-102.
120. C.I.Chen, S.Schaller-Bals, K.P.Paul, U.Wahn, R.Bals (2004). Beta-defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis. *J.Cyst.Fibros.* **3**, 45-50.
121. R.Bals, D.J.Weiner, R.L.Meegalla, F.Accurso, J.M.Wilson (2001). Salt-Independent Abnormality of Antimicrobial Activity in Cystic Fibrosis Airway Surface Fluid. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **25**, 21-25.
122. E.D.Allen (1999). Cystic fibrosis: a decade of progress. *Drugs Today (Barc.)* **35**, 835-848.
123. C.A.Heid, J.Stevens, K.J.Livak, P.M.Williams (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**, 986-994.
124. K.J.Livak, T.D.Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408.
125. C.Galanos, M.A.Freudenberg, W.Reutter (1979). Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 5939-5943.
126. N.Hoffmann, T.B.Rasmussen, P.O.Jensen, C.Stub, M.Hentzer, S.Molin, O.Ciofu, M.Givskov, H.K.Johansen, N.Hoiby (2005). Novel mouse model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking cystic fibrosis. *Infect.Immun.* **73**, 2504-2514.
127. E.Lien, T.K.Means, H.Heine, A.Yoshimura, S.Kusumoto, K.Fukase, M.J.Fenton, M.Oikawa, N.Qureshi, B.Monks, R.W.Finberg, R.R.Ingalls, D.T.Golenbock (2000). Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J.Clin.Invest* **105**, 497-504.
128. C.A.Janeway, Jr., R.Medzhitov (2002). Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* **20**, 197-216.
129. S.Gallucci, M.Lolkema, P.Matzinger (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat.Med.* **5**, 1249-1255.
130. G.S.Tjabringa, J.Aarbiou, D.K.Ninaber, J.W.Drijfhout, O.E.Sorensen, N.Borregaard, K.F.Rabe, P.S.Hiemstra (2003). The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J.Immunol.* **171**, 6690-6696.
131. T.Sawa, K.Kurahashi, M.Ohara, M.A.Gropper, V.Doshi, J.W.Larrick, J.P.Wiener-Kronish (1998). Evaluation of antimicrobial and lipopolysaccharide-neutralizing effects of a synthetic CAP18 fragment against *Pseudomonas aeruginosa* in a mouse model. *Antimicrob.Agents Chemother.* **42**, 3269-3275.

132. M.Maurer, S.E.von (2004). Macrophage inflammatory protein-1. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **36**, 1882-1886.
133. M.Mohamadzadeh, A.N.Poltorak, P.R.Bergstressor, B.Beutler, A.Takashima (1996). Dendritic cells produce macrophage inflammatory protein-1 gamma, a new member of the CC chemokine family. *J Immunol* **156**, 3102-3106.
134. A.N.Poltorak, F.Bazzoni, I.I.Smirnova, E.Alejos, P.Thompson, G.Luheshi, N.Rothwell, B.Beutler (1995). MIP-1 gamma: molecular cloning, expression, and biological activities of a novel CC chemokine that is constitutively secreted in vivo. *J Inflamm.* **45**, 207-219.
135. T.Hara, K.B.Bacon, L.C.Cho, A.Yoshimura, Y.Morikawa, N.G.Copeland, D.J.Gilbert, N.A.Jenkins, T.J.Schall, A.Miyajima (1995). Molecular cloning and functional characterization of a novel member of the C-C chemokine family. *J Immunol* **155**, 5352-5358.
136. M.J.Schultz, A.W.Rijneveld, S.Florquin, C.K.Edwards, C.A.Dinareello, P.T.van der (2002). Role of interleukin-1 in the pulmonary immune response during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* **282**, L285-L290.
137. S.J.Skerrett, T.R.Martin, E.Y.Chi, J.J.Peschon, K.M.Mohler, C.B.Wilson (1999). Role of the type 1  $\alpha$ TNF receptor in lung inflammation after inhalation of endotoxin or *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **276**, L715-L727.
138. M.J.Schultz, A.W.Rijneveld, P.Speelman, S.J.Van Deventer, P.T.van der (2001). Endogenous interferon-gamma impairs bacterial clearance from lungs during *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Eur.Cytokine Netw.* **12**, 39-44.
139. M.J.Schultz, S.Knapp, S.Florquin, J.Pater, K.Takeda, S.Akira, T.van der Poll (2003). Interleukin-18 Impairs the Pulmonary Host Response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.* **71**, 1630-1634.
140. G.Kuwajima, J.Asaka, T.Fujiwara, T.Fujiwara, K.Node, E.Kondo (1986). Nucleotide sequence of the hag gene encoding flagellin of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **168**, 1479-1483.



**Folgende Publikationen sind während der Anfertigung dieser Arbeit entstanden oder sind noch in Bearbeitung:**

Human endogenous antibiotic LL-37 stimulates airway epithelial cell proliferation and wound closure.

Shaykhiev R, Beisswenger C, Kandler K, Senske J, Puchner A, Damm T, Behr J, Bals R.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005 Nov; 289(5):L842-8.

Allergic airway inflammation inhibits pulmonary antibacterial host defense.

Beisswenger\* C, Kandler\* K, Hess C, Garn H, Felgentreff K, Wegmann M, Renz H, Vogelmeier C, Bals R

J Immunol 2006 177: 1833-1837; \* gemeinsame Erstautoren

The antimicrobial peptide LL-37 inhibits the activation of dendritic cells by TLR ligands.

Kandler K, Shaykhiev R, Kleemann P, Kleszcz F, Vogelmeier C, Lohoff M, Bals R  
Eingereicht

The murine endogenous antibiotic CRAMP is upregulated during pulmonary infection.

Kandler K, Beisswenger C, Puchner A, Bals R  
Eingereicht

The murine cathelicidin CRAMP is a negative regulator of innate immunity.

Kandler K, Alalwani S, Hess C, Bals R  
In Bearbeitung

**Meine akademischen Lehrer waren Damen und Herren in Jena, Marburg und Regensburg:**

Agricola

Bals

Große

Jaenicke

Kohler

Liebmann

Möllmann

Reißmann

Sauer

Sumper

Tanner

Wöstemeyer

Zipfel

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Dr. Robert Bals für die Bereitstellung des Themas, die große Unterstützung meines Projekts und seine Hilfe bei allen praktischen und theoretischen Fragen.

Bei Herrn Prof. Lohoff möchte ich mich für das Interesse und die Hilfe bei dem Projekt zur Aktivierung von Dendritischen Zellen bedanken.

Peter Kleemann danke ich für die Hilfe bei der Durchführung des Experiments zur Aktivierung von T Zellen durch Dendritische Zellen.

Bei Dr. Holger Garn und Anja Spies möchte ich mich für die Beantwortung vieler Fragen und ganz besonders für die Einweisung am FACS Gerät bedanken.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern des „Bals Lab“ möchte ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit danken. Ihr habt mich gleich so freundlich aufgenommen, dass ich von Anfang an gern in Marburg und dieser Arbeitsgruppe war.

Insbesondere möchte ich mich bei Christian Hess für das „gemeinsame Durchstehen von Anfang an“, die große Hilfsbereitschaft und die vielen Diskussionen bedanken.

Thomas Damm und Katrin Rüttger danke ich für die Hilfe bei der Mausezucht.

Annette Püchner möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und ganz besonders für das Zählen der vielen, vielen BALs danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Christoph Beisswenger für die Hilfe und Unterstützung bei praktischen und theoretischen Fragen zu dieser Arbeit, die vielen Diskussionen über mein Projekt und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Außerdem danke ich meiner Familie für die Unterstützung während der kompletten Zeit meiner Ausbildung.